

UNTERSUCHUNGEN  
ZUR PHYSIOLOGIE UND REGULATION  
DES GÄRUNGSSTOFFWECHSELS  
VON ESCHERICHIA COLI

Anita Pecher

Diss  
München  
1984







UNTERSUCHUNGEN ZUR PHYSIOLOGIE UND REGULATION

DES GÄRUNGSSTOFFWECHSELS VON ESCHERICHIA COLI

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Anita Pecher

aus

Schwarzach

---

Juli 1984

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

2. Gutachter: Prof. Dr. Schweyen

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.1984

## ABKÜRZUNGEN

|                       |                                                             |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------|
| ADP                   | Adenosindiphosphat                                          |
| ATP                   | Adenosintriphosphat                                         |
| BV                    | Benzylviologen                                              |
| $^{14}\text{C}$       | radioaktives Kohlenstoffisotop mit Massenzahl 14            |
| CAP                   | Katabolit-Aktivator-Protein                                 |
| Ci                    | Curie                                                       |
| cyclo-AMP             | zyklisches Adenosinmonophosphat                             |
| DCPIP                 | Dichlorphenolindophenol                                     |
| DNA                   | Desoxyribonucleinsäure                                      |
| EDTA                  | Äthylendiamintetraacetat                                    |
| FAD                   | Flavin-adenin-dinucleotid                                   |
| $\text{FDH}_\text{H}$ | Formiat-Dehydrogenase (assoziiert mit der Hydrogenase)      |
| $\text{FDH}_\text{N}$ | Formiat-Dehydrogenase (assoziiert mit der Nitrat-Reduktase) |
| Fp                    | Flavoprotein                                                |
| $^3\text{H}$          | radioaktives Wasserstoffisotop mit Massenzahl 3 (Tritium)   |
| Kd                    | Kilodalton                                                  |
| mRNA                  | messenger Ribonucleinsäure                                  |
| NAD                   | Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid                         |
| PEP                   | Phosphoenolpyruvat                                          |
| PFL                   | Pyruvat-Formiat-Lase                                        |
| PMS                   | Phenazinmethosulfat                                         |
| SAM                   | S-Adenosylmethionin                                         |
| $^{35}\text{S}$       | radioaktives Schwefelisotop mit Massenzahl 35               |
| SDS                   | Natriumdodecylsulfat                                        |
| $^{75}\text{Se}$      | radioaktives Selenisotop mit Massenzahl 75                  |
| Tris                  | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                              |
| UV                    | ultraviolettes Licht                                        |
| WM                    | Werkman Medium                                              |



## INHALTSVERZEICHNIS

---

|                                                                            | <u>Seite</u> |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------|
| A. EINLEITUNG                                                              | 1            |
| 1. Die verschiedenen Stoffwechsellmöglichkeiten<br>fakultativer Organismen | 1            |
| a) Gärung ( <i>Fermentation</i> )                                          | 1            |
| b) Atmung ( <i>Respiration</i> )                                           | 1            |
| c) Anaerobe Atmung ( <i>anaerobe Respiration</i> )                         | 2            |
| 2. Ablauf der gemischten Säuregärung                                       | 3            |
| 3. Regulationsphänomene des anaeroben Glucoseabbaus                        | 5            |
| a) Regulation der Glykolyseenzyme                                          | 5            |
| b) Zitronensäurezyklus unter anaeroben Wachstums-<br>bedingungen           | 5            |
| c) Regulation der Pyruvat-Formiat-Lyase                                    | 6            |
| d) Regulation der Formiat-Hydrogenlyase-<br>Reaktionssequenz               | 7            |
| e) Regulation durch das <i>fnr</i> -Genprodukt                             | 10           |
| f) Regulation durch <i>cyclo-AMP</i>                                       | 11           |
| g) Regulation durch ein Repressorprotein                                   | 11           |
| B. MATERIAL UND METHODEN                                                   | 14           |
| 1. Verwendete E. coli Stämme                                               | 14           |
| 2. Medien                                                                  | 16           |
| 3. Wachstum von Bakterien                                                  | 17           |
| 3.1 Aerobe Anzucht                                                         | 17           |
| 3.2 Anaerobe Anzucht                                                       | 18           |
| 4. Herstellen von Rohextrakten                                             | 18           |
| 4.1 Extrakte für O'Farrell Gelelektrophorese                               | 18           |
| 4.2 Zelleextrakte für eindimensionale Gel-<br>elektrophorese               | 19           |
| 4.3 Extraktbereitung beim "pulse-chase" Experiment                         | 19           |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. P1 Transduktion der <u>lac</u> -Fusionen                                 | 19 |
| 6. Physiologische Tests                                                     | 20 |
| 6.1 Wachstum auf verschiedenen C-Quellen                                    | 20 |
| 6.2 Überprüfung des "Umschaltphänotyps" auf<br>MacConkey Agarplatten        | 20 |
| 6.3 Test auf Gasbildung                                                     | 20 |
| 6.4 Test auf benzylviologenabhängige $FDH_H$ -<br>Aktivität                 | 20 |
| 6.5 Überprüfung der UV-Sensitivität                                         | 20 |
| 7. Enzymtests                                                               | 21 |
| 7.1 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität                          | 21 |
| 7.2 Hydrogenasetest                                                         | 21 |
| 7.3 Formiat-Dehydrogenase-Test                                              | 21 |
| 7.3.1 $FDH_H$ Reaktion mit Benzylviologen                                   | 21 |
| 7.3.2 $FDH_N$ Reaktion mit Phenazinmetho-<br>sulfat/Dichlorphenolindophenol | 22 |
| 8. Markierungen mit verschiedenen Isotopen                                  | 22 |
| 8.1 Markierung mit $^{35}S$ -Sulfat                                         | 22 |
| 8.2 Differentielle Markierung mit $^3H$ - bzw. $^{14}C$ -<br>L-Leucin       | 23 |
| 8.3 Markierung mit $^{35}S$ -L-Methionin im "pulse-<br>chase" Experiment    | 24 |
| 8.4 Markierung mit $^{75}Se$ -Selenit                                       | 24 |
| 9. Bestimmung der eingebauten Radioaktivität                                | 24 |
| 9.1 Bestimmung der Radioaktivität im Gesamt-<br>zellprotein                 | 24 |
| 9.2 Messung der Radioaktivität in einzelnen<br>Proteinen                    | 25 |
| 10. Elektrophoretische Methoden                                             | 25 |
| 10.1 Zweidimensionale Elektrophorese                                        | 25 |
| 10.2 Eindimensionale Gelelektrophorese                                      | 25 |
| 10.3 Agarose Gelelektrophorese                                              | 25 |
| 11. Färben der Gele und Autoradiographie                                    | 26 |
| 12. Proteinbestimmung                                                       | 26 |
| 13. Maxizelllexperiment                                                     | 26 |

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 14. Limitierte Proteolyse                          | 27 |
| 15. Spaltung mit Bromcyan                          | 27 |
| 16. Transformation und Restriktionsanalysen        | 28 |
| 17. Plasmidisolierung                              | 28 |
| 18. Liste besonderer Chemikalien und Bezugsquellen | 28 |

## C. ERGEBNISSE 29

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Umstellung der Proteinausstattung fakultativer Organismen beim Übergang von Aerobiose auf Anaerobiose                                      | 29 |
| 1.1 Qualitative Untersuchungen                                                                                                                | 29 |
| 2. Charakterisierung der Pyruvat-Formiat-Lyase                                                                                                | 36 |
| 2.1 Elektrophoretisches Verhalten                                                                                                             | 36 |
| 2.2 Identifizierung als anaerob induziertes Enzym                                                                                             | 36 |
| 2.3 Quantitative Bestimmung der steady-state Konzentrationen der PFL und weiterer Polypeptide, deren Synthese durch Sauerstoff reguliert wird | 37 |
| 2.4 Aufklärung der Untereinheitenstruktur                                                                                                     | 40 |
| 2.4.1 Pulse chase Experiment                                                                                                                  | 40 |
| 2.4.2 Limitierte Proteolyse                                                                                                                   | 41 |
| 2.5 Identifizierung des Strukturgens der PFL auf dem Plasmid p29                                                                              | 42 |
| 2.5.1 Synthese der auf p29 kodierten Polypeptide im Maxizellsystem                                                                            | 45 |
| 2.5.2 Limitierte Proteolyse                                                                                                                   | 46 |
| 2.6 Untersuchungen zur Gen-Dosis-Abhängigkeit der PFL Synthese                                                                                | 46 |
| 3. Untersuchung zur Regulation anaerob induzierter Enzymsysteme anhand von <u>lac</u> -Fusionsstämmen                                         | 49 |
| 3.1 Lokalisation der Mu-Insertion                                                                                                             | 49 |
| 3.1.1 Hydrogenasetest                                                                                                                         | 52 |
| 3.1.2 Benzylviologen-Reduktion                                                                                                                | 53 |
| 3.2 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Fusionsstämmen                                                                      | 54 |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1 Einfluß anderer Säuren auf die $\beta$ -Galaktosidasesynthese                                   | 56 |
| 3.2.2 Einfluß der <u>pfl</u> -Mutation auf die $\beta$ -Galaktosidasesynthese in den Fusionsstämmen   | 57 |
| 3.2.3 Einfluß der <u>fnr</u> -Mutation auf die $\beta$ -Galaktosidasesynthese in den Fusionsstämmen   | 58 |
| 4. Untersuchungen zur Struktur und Regulation der Selenopeptide der $FDH_H$ und $FDH_N$               | 60 |
| 4.1 Markierung der Selenopeptide mit $^{75}Se$ -Selenit                                               | 60 |
| 4.2 Regulation der Synthese des verkürzten Selenopeptids                                              | 62 |
| 4.3 Untersuchungen zur Identität des verkürzten Peptids mit dem Selenopeptid der $FDH_H$ des Wildtyps | 63 |
| 4.4 Identifizierung der Selenopeptide der $FDH_N$ und $FDH_H$ auf O'Farrell-Gelen                     | 65 |
| D. DISKUSSION                                                                                         | 68 |
| 1. Untersuchungen an der Pyruvat-Formiat-Lyase                                                        | 68 |
| 1.1 Regulatorische Eigenschaften                                                                      | 68 |
| 1.2 Klonierung des Strukturgens der Pyruvat-Formiat-Lyase                                             | 70 |
| 1.3 Strukturelle Eigenschaften                                                                        | 70 |
| 2. Regulationsverhalten anderer Proteine                                                              | 71 |
| 3. Untersuchungen mit Hilfe von <u>lac</u> -Fusionsstämmen                                            | 72 |
| 3.1 <u>hyd::lac</u> Fusion                                                                            | 72 |
| 3.2 <u>fdh::lac</u> Fusion                                                                            | 73 |
| 3.3 Regulation der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität                                                    | 73 |
| 3.4 Regulation durch das FNR-Protein                                                                  | 74 |
| 3.5 Eigenschaften redoxinsensitiver Mutanten                                                          | 75 |
| 4. Charakterisierung der <u>fdhH::lac</u> Fusion                                                      | 76 |
| E. ZUSAMMENFASSUNG                                                                                    | 78 |
| F. LITERATURVERZEICHNIS                                                                               | 81 |

## A. EINLEITUNG

---

*Escherichia (E.) coli*, ein Vertreter der gram-negativen, chemoheterotrophen Bakterien, kann eine Vielzahl von organischen Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden. Der Energiegewinn erfolgt über eine Reihe von Oxidations-Reduktionsreaktionen. Je nach Art des terminalen Elektronenakzeptors unterscheidet man dabei verschiedene Abbauewege.

### 1. Die verschiedenen Stoffwechsellmöglichkeiten fakultativer Organismen

#### a) Gärung (*Fermentation*)

Als Fermentation bezeichnet man heute üblicherweise Stoffwechselwege, bei denen das organische Substrat sowohl als Elektronenakzeptor als auch als Elektronendonator verwendet wird. Dabei entsteht eine festgelegte Mischung von Endprodukten, von denen einige stärker reduziert und einige stärker oxidiert sind als das Ausgangsprodukt. Der durchschnittliche Oxidationszustand der Endprodukte ist identisch mit dem des Substrats. Bei einer Fermentation entsteht ATP, der universelle Energieträger der Zelle, über Substratkettensphosphorylierung. Dabei wird eine energiereiche Phosphatgruppe eines Zwischenprodukts, das während des Kohlenhydratabbaus gebildet wird, auf ADP übertragen.

#### b) Atmung (*Respiration*)

Bei Anwesenheit von Sauerstoff dient dieser als terminaler Elektronenakzeptor. Organische Substrate wie zum Beispiel Glucose werden dabei - im Gegensatz zur anaeroben Glucosevergärung - vollständig zu Kohlendioxid oxidiert.

Dies erklärt auch die Tatsache, daß anaerob lebende Zellen sehr viel mehr Glucose verbrauchen als aerob lebende, um daraus die gleichen Beträge nutzbarer Energie gewinnen zu können (Pasteureffekt). Die Koppelung der Substratoxidation mit der Reduktion eines externen Elektronenakzeptors ist charakteristisch für einen respiratorischen Metabolismus. Die beim Kohlenhydratabbau durch den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg und den Zitronensäurezyklus gewonnenen Redox-äquivalente werden, falls nicht im Anabolismus benötigt, in der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen. Die Anwesenheit einer Reihe von spezifischen Elektronenüberträgermolekülen, auch Atmungskette genannt, ist ein gemeinsames Merkmal aller respiratorischen Abbauewege.

Durch vektoriellen Elektronentransport kommt es zum Aufbau eines Elektronen- und pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran, dessen Abbau mit der Phosphorylierung von ADP gekoppelt ist. Der Hauptmechanismus der ATP-Gewinnung bei einer Respiration wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet.

#### c) *Anaerobe Atmung (anaerobe Respiration)*

*E. coli* besitzt die Fähigkeit, anstelle von Sauerstoff auch Nitrat, Fumarat oder Trimethylaminoxid als terminale Elektronenakzeptoren zu verwenden (Haddock und Jones, 1977; Hirsch et al., 1963; Cox und Knight, 1981; Takagi und Ishimoto, 1983). Diese Art der Respiration wird auch als anaerobe Atmung bezeichnet. Sie wird genau wie der Gärungsstoffwechsel nur unter Sauerstoffausschluß durchgeführt, unterliegt also der Kontrolle durch Sauerstoff.

Bakterien, die einen Gärungsstoffwechsel besitzen, gehören entweder zur Gruppe der obligat oder fakultativ anaeroben Organismen. *E. coli* zählt zur letzteren Gruppe, kann also sowohl in Anwesenheit von Sauerstoff (aerob) als auch in seiner Abwesenheit (anaerob) leben.

Die Anwesenheit eines Elektronenakzeptors läßt, abhängig von der Höhe des Redoxpotentials, eine höhere Energieaus-

beute zu; aufgrund eines daran "angepaßten" Regulationsmechanismus schalten fakultative Organismen auf Respiration um, sobald ein externer Elektronenakzeptor zur Verfügung steht. Für die Zelle ist es daher unerläßlich, über eine Reihe von Kontrollmechanismen ihren Metabolismus an die jeweiligen Wachstumsbedingungen anzupassen. Dabei setzt die Regulation grundsätzlich auf zwei verschiedenen Ebenen ein: einmal auf der Ebene der Enzymsynthese und zum anderen auf der Ebene der Regulation der Enzymaktivität. Der anaerobe Energiestoffwechsel von *E. coli* soll in dieser Hinsicht anhand von Abbildung 1 erläutert werden.

## 2. Ablauf der gemischten Säuregärung

Glucose wird über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg metabolisiert, wobei pro Mol Glucose zwei ATP gebildet werden. Pyruvat wird durch die Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL), ein zentrales Enzym des anaeroben Stoffwechsels, in einer nicht oxidativen Spaltung in Acetyl-Coenzym A und Formiat umgewandelt (Kalnitsky und Werkman, 1943; Utter und Werkman, 1944; Varenne et al., 1975).

Durch die meisten Enterobakterien wird Formiat als Hauptendprodukt gebildet (Gattung: *Shigella*, *Erwinia*). Einige Gruppen, darunter auch *E. coli*, besitzen jedoch zusätzlich ein Formiatabbauendes Enzymsystem, den Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplex, dessen Synthese bei saurem pH-Wert induziert wird (Peck und Gest, 1957).

Dadurch wird Formiat in Kohlendioxid und Wasserstoff gespalten, und es erscheint nur mehr wenig Formiat als Endprodukt. Acetyl-Coenzym A wird durch die Phosphotransacetylase und Acetatskinase in Acetat umgewandelt, wobei ein weiteres Mol ATP gewonnen wird.

Daneben entsteht in der gemischten Säuregärung eine nicht unerhebliche Menge Äthanol. Acetyl-Coenzym A wird unter Verbrauch von Redoxäquivalenten über Acetaldehyd schließlich zu Äthanol reduziert.

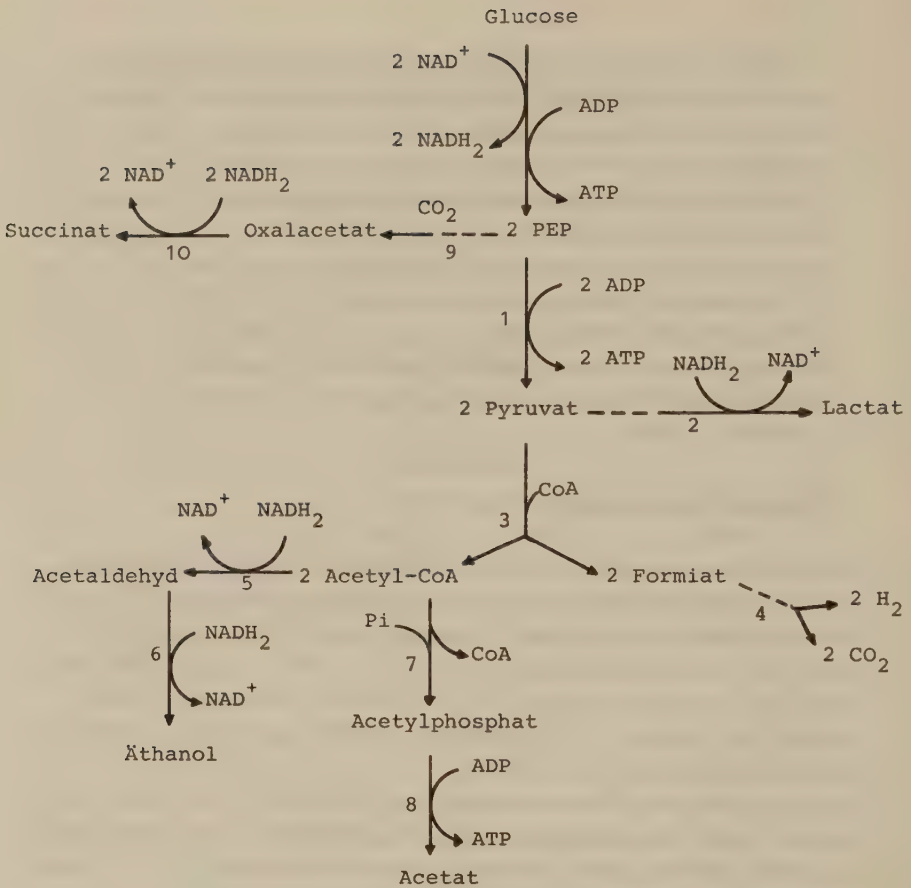


Abbildung 1: Reaktionsschema der gemischten Säuregärung

- Enzyme:
- 1 = Pyruvatkinase
  - 2 = Lactat-Dehydrogenase
  - 3 = Pyruvat-Formiat-Lyase
  - 4 = Formiat-Hydrogen-Lyase
  - 5 = Acetaldehyd-Dehydrogenase
  - 6 = Alkohol-Dehydrogenase
  - 7 = Phosphotransacetylase
  - 8 = Acetatkinase
  - 9 = PEP-Carboxylase
  - 10 = Malat-Dehydrogenase, Fumarase, Fumarat-Reduktase

### 3. Regulationsphänomene des anaeroben Glucoseabbaus

Sauerstoff spielt eine wichtige regulatorische Rolle, da er einerseits als starkes Oxidationsmittel der bevorzugte Elektronenakzeptor in der Zelle ist, zum anderen wegen seiner chemischen Aggressivität eine Reihe von Enzymsystemen des anaeroben Stoffwechsels inaktiviert (Peck und Gest, 1957; Knappe et al., 1972; Cole und Wimpenny, 1966; Adams und Hall, 1979; Chippaux et al., 1978; Pecher et al., 1982).

#### *a) Regulation der Glykolyseenzyme*

Ein Großteil der Enzyme der Glucosevergärung wird sowohl im aeroben als auch im anaeroben Metabolismus benötigt. Sie unterliegen nur einer schwachen Kontrolle durch Sauerstoff. Einige Glykolyseenzyme wie Phosphoglucoseisomerase oder Phosphofructokinase zeigen eine langsame Derepression bei Übergang auf Anaerobiose (Schreyer und Böck, 1980; Kotlarz et al., 1975).

#### *b) Zitronensäurezyklus unter anaeroben Wachstumsbedingungen*

Ausgehend von Phosphoenolpyruvat (PEP), das durch Carboxylierung in Oxalacetat überführt wird (PEP-Carboxylase), benutzt die Zelle den reduktiven Zweig des Zitronensäurezyklus zur Reoxidation von  $\text{NADH}_2$ . Das terminale Enzym dieser Reaktionskette ist die Fumarat-Reduktase, die die Hydrierung von Fumarat zu Succinat katalysiert (Hirsch et al., 1963). Bei dieser Reaktion kommt es zu einer weiteren Bildung von ATP.

Der oxidative Zweig des Zitronensäurezyklus läuft nur bis zur Stufe des  $\alpha$ -Ketoglutarats ab, da die Synthese der Komponenten des  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Enzymkomplexes analog der des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes unter anaeroben Bedingungen reprimiert ist (Hansen und Henning, 1966; Amarsingham und Davis, 1965).

c) Regulation der Pyruvat-Formiat-Lyase

Das Enzym Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) nimmt eine Schlüsselrolle im anaeroben Metabolismus von *E. coli* ein. Der Vorteil dieser nicht oxidativen Pyruvatspaltung besteht darin, daß keine zusätzlichen Redoxäquivalente gebildet werden (Knappe et al., 1972). Trotz der Bedeutung dieser Reaktion war ihr Mechanismus lange unaufgeklärt. Der Grund liegt primär in der extremen Sauerstofflabilität des Enzyms (Novelli et al., 1954; Oster und Wood, 1964). Bei Sauerstoffzufuhr wird es innerhalb weniger Sekunden irreversibel inaktiviert. In einem Medium mit einem Redoxpotential von -200 mV hingegen ist das Enzym einigermaßen stabil, wenngleich es auch hier mit einer Halbwertszeit von zirka 50 Minuten reversibel in eine inaktive Form überführt wird (Knappe et al., 1969; Knappe et al., 1974). Die inaktive, oxidierte Form des Enzyms ist jedoch durch einen enzymatischen Prozeß überführbar in seine aktive Form (siehe Abbildung 2).

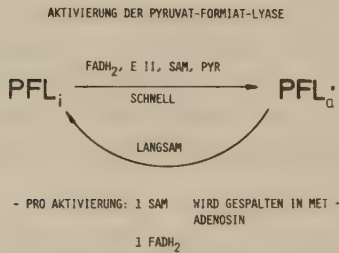


Abbildung 2: Aktivierungsreaktion der Pyruvat-Formiat-Lyase

Die Aktivierung des Enzyms erfordert dabei folgende Bedingungen:

- ein Redoxpotential von -390 mV bis -440 mV
  - reduziertes Flavodoxin als Elektronendonator
  - Gegenwart einer katalytischen Menge an Pyruvat
  - Anwesenheit von Enzym II (PFL-Aktivase)
  - Anwesenheit von S-Adenosylmethionin (wird während des Aktivierungsprozesses in Adenosin und Methionin gespalten)
- (Knappe und Blaschkowski, 1975)

Bei der aktiven Form des Enzyms handelt es sich um ein Radikalenzym (Knappe et al., 1984). Aber nicht nur die Aktivität des Enzyms wird durch Sauerstoff gesteuert, sondern auch seine Synthese (Pecher et al., 1982; diese Arbeit). Durch Markierungsversuche unter Gleichgewichtsbedingungen konnte nämlich gezeigt werden, daß die Synthese unter anaeroben Bedingungen um das Vier- bis Sechsfache gesteigert ist, gegenüber der Synthese unter aeroben Bedingungen.

d) *Regulation der Formiat-Hydrogenlyase-Reaktionssequenz*

Formiat wird durch den Enzymkomplex Formiat-Hydrogen-Lyase in die gasförmigen Produkte Wasserstoff und Kohlendioxid gespalten (Peck und Gest, 1957). Der Enzymkomplex setzt sich aus der formiatoxidierenden Formiat-Dehydrogenase ( $\text{FDH}_H$ ), noch weitgehend unbekannten Elektronencarriern ( $X_1$  und  $X_2$ ) und der Hydrogenase zusammen. Die Hydrogenase katalysiert schließlich die Übertragung der Elektronen auf Protonen und führt damit zur Freisetzung von molekularem Wasserstoff, der ständig aus dem Gleichgewicht entweicht.

An der Reduktion von Nitrat zu Nitrit unter anaeroben Bedingungen (Nitratatmung) ist ebenfalls eine Formiat-Dehydrogenase ( $\text{FDH}_N$ ) beteiligt. Sie ist membrangebunden und assoziiert mit einer Reihe von Elektronenüberträgermolekülen,

die ebenfalls in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Der letzte Schritt dieser Reaktionssequenz wird von der membrangebundenen respiratorischen Nitrat-Reduktase katalysiert.

In Abbildung 3 sind die von den beiden Formiat-Dehydrogenasen katalysierten Reaktionsketten schematisch dargestellt.

Die beiden Formiat-Dehydrogenasen ( $\text{FDH}_H$  und  $\text{FDH}_N$ ) unterscheiden sich nun in vielerlei Hinsicht, haben aber auch gemeinsame Merkmale:

- Synthese und Aktivität beider Formiat-Dehydrogenasen werden durch Sauerstoff gehemmt (Shaw und DeMoss, 1968; Wimpenny und Cole, 1967; Gray et al., 1966b; Pichinoty, 1962; Pichinoty, 1969);
- beide Enzyme enthalten Molybdän und Selen als Cofaktoren (Pinsent, 1954; Lester und DeMoss, 1971);
- es existiert eine Reihe von pleiotropen Mutanten, zum Beispiel fdhA-, fdhB-Mutanten, in denen durch eine einzige Mutation beide Funktionen ausfallen (Stouthamer, 1969; Glaser und DeMoss, 1972; Haddock und Jones, 1977; Mandrand-Berthelot et al., 1978);
- als künstliche Elektronenakzeptoren fungieren für die  $\text{FDH}_H$  Methylviologen und Benzylviologen, nicht aber Methylenblau, Phenazinmethosulfat und Dichlorphenolindophenol;
- die  $\text{FDH}_N$  zeigt gerade die umgekehrte Spezifität gegenüber diesen Redoxkörpern (Peck und Gest, 1957; Ruiz-Herrera und DeMoss, 1969);
- unter rein fermentativen Bedingungen wird nur die Synthese der  $\text{FDH}_H$  nicht aber der  $\text{FDH}_N$  induziert; mit Nitrat als



Elektronenakzeptor (anaerob) wird ausschließlich  $\text{FDH}_\text{N}$  exprimiert (Ruiz-Herrera et al., 1972);

- unterschiedlich ist auch die Lokalisation beider Enzyme; während  $\text{FDH}_\text{H}$  im Cytoplasma vorkommt, ist die  $\text{FDH}_\text{N}$  membran-gebunden (Terrière et al., 1981; Ruiz-Herrera et al., 1972; Cox et al., 1981);
- Antiserum gegen gereinigte  $\text{FDH}_\text{N}$  zeigt keine Kreuzreaktion mit  $\text{FDH}_\text{H}$  (Graham et al., 1980a);
- die Stabilität beider Enzyme ist unterschiedlich: die  $\text{FDH}_\text{H}$  ist äußerst labil, die  $\text{FDH}_\text{N}$  dagegen relativ stabil;
- unterschiedlich ist auch die Größe der in beiden Enzymen enthaltenen Selenopeptide; das Selenopeptid der  $\text{FDH}_\text{H}$  hat ein Molekulargewicht von 80 Kilodalton (Kd), das der  $\text{FDH}_\text{N}$  110 Kd (Cox et al., 1981).

e) *Regulation durch das fnr-Genprodukt*

In verschiedenen Arbeitsgruppen wurden Mutanten isoliert, die nicht mehr in der Lage sind, anaerob auf Nitrat oder Fumarat zu wachsen (Lambden und Guest, 1976; Newman und Cole, 1978; Chippaux et al., 1978). Die im fnr-Gen lokalisierte Mutation führt zum gleichzeitigen Ausfall verschiedener anaerob induzierter Enzyme wie Fumarat-, Nitrit- und Nitrat-Reduktase, Hydrogenase, Formiat-Dehydrogenase, Formiat-Hydrogen-Lyase und Cytochrom  $\text{C}_{552}$ .

Um genaue Kenntnisse über Struktur und Funktion dieses Proteins zu gewinnen, wurde das fnr-Gen kloniert und die Primärstruktur des Proteins anhand der Nucleotidsequenz bestimmt (Shaw und Guest, 1981; 1982 a,b).

Das FNR-Protein zeigt dabei auffällige Sequenzhomologien mit bereits bekannten Regulatorproteinen wie Katabolit-aktivatorprotein (CAP), Laktoserepressorprotein (Lac-Repressor) und Galactoserepressorprotein (Shaw et al., 1983;

Shaw und Guest, 1982b). Besonders die DNA-Binderegion dieser Proteine ist stark konserviert. Diese weitgehenden strukturellen Übereinstimmungen führten zu dem Schluß, daß das FNR-Protein genau wie das CAP-Protein an die Promotorregion der regulierten Gene bindet und die Transkription aktiviert. Die Aktivität des FNR-Proteins könnte wiederum durch ein weiteres Effektormolekül, das zum Beispiel den Redoxzustand sensiert, gesteuert werden. Eine Beeinflussung der Aktivität des Regulatorproteins durch cyclo-AMP war zunächst abgelehnt worden, da der cyclo-AMP Bindestelle des CAP-Proteins keine homologe Region des FNR-Proteins gleichkommt (Shaw et al., 1983; McKay et al., 1982).

*f) Regulation durch cyclo-AMP*

Neuere Ergebnisse zeigen jedoch unerwarteterweise, daß die Transkription des frd-Gens sehr wohl von cyclo-AMP abhängig ist (Unden und Guest, 1984).

Der Einfluß von cyclo-AMP auf die Transkription anderer "anaerober" Gene bleibt zu überprüfen. Ob die Wirkung von cyclo-AMP wie beim CAP-Protein durch Bindung an das Aktivatorprotein zustande kommt, bleibt ebenfalls noch zu klären.

*g) Regulation durch ein Repressorprotein*

Die gegenseitige Umwandlung von Fumarat und Succinat unterliegt einer strengen Kontrolle durch Sauerstoff. Im aeroben Stoffwechsel katalysiert die Succinat-Dehydrogenase, ein Enzym des Zitronensäurezyklus, die Dehydrierung zu Fumarat. Sie ist unter anaeroben Bedingungen reprimiert und wird ersetzt durch die Fumarat-Reduktase, die die reverse Reaktion katalysiert und entgegengesetztes regulatorisches Verhalten zeigt (Hirsch et al., 1963; Spencer und Guest, 1973).

Erhöhung der Gendosis des frd-Gens durch Klonierung auf einem hitzeinduzierbaren  $\lambda$ -Phagen hebt die aerobe Repression teilweise auf. Dies ist ein starker Hinweis für die Existenz eines Repressorproteins, dessen Wirkung durch Genamplifikation austitriert wurde (Cole und Guest, 1978; 1980).

Als übergeordneter Regulationsmechanismus könnte demnach der Redoxzustand der Zelle einen Einfluß auf Synthese oder Aktivität des Repressors ausüben.

Zusammenfassend lassen sich also mehrere Regulationsmechanismen, die den Kohlenhydratabbau in *E. coli* unter anaeroben Wachstumsbedingungen steuern, aufstellen:

- Schwache Repression der Synthese der Glykolyseenzyme durch Sauerstoff
- Regulation der Pyruvat-Formiat-Lyase-Reaktion, einer zentralen Reaktion des anaeroben Stoffwechsels
- Regulation verschiedener Reaktionssequenzen durch spezifische Induktoren, zum Beispiel Nitrat, Fumarat
- Generelle Kontrolle durch das FNR-Protein
- Einfluß von cyclo-AMP
- Existenz eines Repressors, der die aerobe Synthese anaerober Enzyme verhindert
- Einfluß des Redoxzustandes der Zelle, als möglicherweise übergeordneter Parameter, auf die Synthese der verschiedenen Effektormoleküle

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen, die die Synthese von Gärungsenzymen durch Sauerstoff steuern, kennenzulernen. Dazu wurden zunächst Veränderungen in der Gesamtproteinausstattung der Zellen beim Übergang zur Anaerobiose mit der Methode der O'Farrell-Gelelektrophorese (O'Farrell, 1975; O'Farrell et al., 1977) untersucht.

Anhand von lac-Fusionen in einzelnen Enzymsystemen des Gärungs-

stoffwechsels konnte genaue Einsicht in deren individuelle Regulation gewonnen werden.

---

## B. MATERIAL UND METHODEN

---

### 1. Verwendete E. coli Stämme

Genotyp und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten E. coli Stämme sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Genbezeichnung entspricht der von Bachmann et al. (1976). Für die Transduktionsexperimente wurde der Bakteriophage P1 kc aus der Institutssammlung verwendet.

Die Stammkulturen wurden in 50 % Glycerin bei -20°C, Lysate bei -4°C über einem Tropfen Chloroform aufbewahrt.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Bakterienstämme

| Stamm         | Genotyp                                                                                                       | Herkunft<br>bzw.<br>Referenz  |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| KL19          | Hfr, prototroph, lambda-lysogen                                                                               | CGSC 4290                     |
| KL10 p29      | wie KL19 mit Plasmid p29                                                                                      | diese Arbeit                  |
| KL19 pACYC184 | wie KL19 mit Plasmid pACYC184                                                                                 |                               |
| MC4100        | $\Delta(\text{argF-lac})\text{araD}$ , <u>ptsF</u> , <u>deoC</u> ,<br><u>flbB</u> , <u>relA</u> , <u>rpsL</u> | CGSC 6152                     |
| M3s           | wie MC4100, <u>hyd</u> :Mu <u>d1</u> ,<br>temperaturinsensitiv                                                | Zinoni, Dipl.<br>Arbeit, 1983 |
| M9s           | wie MC4100, <u>fdhH</u> :Mu <u>d1</u> ,<br>temperaturinsensitiv                                               | Zinoni, Dipl.<br>Arbeit, 1983 |
| M16s          | wie MC4100, nicht definierte<br>Fusion, temperaturinsensitiv                                                  | Zinoni, Dipl.<br>Arbeit, 1983 |

Fortsetzung - Tabelle 1

| Stamm      | Genotyp                                                                                                                                                                                                                                                    | Herkunft<br>bzw.<br>Referenz  |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| M17s       | wie MC4100, <u>hyd::Mu d1</u> ,<br>temperaturinsensitiv                                                                                                                                                                                                    | Zinoni, Dipl.<br>Arbeit, 1983 |
| CB898      | <u>thr-1</u> , <u>leu-6</u> , <u>lacY1</u> , <u>tonA22</u> ,<br><u>thi-1</u> , <u>pfl-1</u> , <u>rpsL</u>                                                                                                                                                  | CGSC 6161                     |
| CB898 M3s  | wie CB898, <u>hyd::Mu d1</u>                                                                                                                                                                                                                               | diese Arbeit                  |
| CB898 M9s  | wie CB898, <u>fdhH::Mu d1</u> ,<br>temperaturinsensitiv                                                                                                                                                                                                    | diese Arbeit                  |
| CB898 M16s | wie CB898, nicht definierte<br>Fusion, temperaturinsensitiv                                                                                                                                                                                                | diese Arbeit                  |
| CB898 M17s | wie CB898, <u>hyd::Mu d1</u> ,<br>temperaturinsensitiv                                                                                                                                                                                                     | diese Arbeit                  |
| CSR603     | <u>thr-1</u> , <u>leuB6</u> , <u>proA2</u> , <u>argF3</u> ,<br><u>phr-1</u> , <u>recA1</u> , <u>uvrA6</u> , <u>thi-1</u> ,<br><u>ara-14</u> , <u>lacY1</u> , <u>galK2</u> , <u>xyl-5</u> ,<br><u>mtl-1</u> , <u>rpsL31</u> , <u>tsx-33</u> , <u>supE44</u> | CGSC 5830                     |
| SP264      | wie CSR603 mit Plasmid p29                                                                                                                                                                                                                                 |                               |
| IRG861a    | <u>fnr-1</u> , <u>gal</u> , <u>trpA9761</u> , <u>iclR</u> ,<br><u>trpR</u> , <u>rpsL</u>                                                                                                                                                                   | J. R. Guest                   |
| FM56       | wie IRG861a, $\Delta(\text{argF-lac})$                                                                                                                                                                                                                     | F. Zinoni                     |
| FM56 M3s   | wie FM56, <u>hyd::Mu d1</u> ,<br>temperaturinsensitiv                                                                                                                                                                                                      | diese Arbeit                  |
| FM56 M9s   | wie FM56, <u>fdhH::Mu d1</u> ,<br>temperaturinsensitiv                                                                                                                                                                                                     | diese Arbeit                  |
| FM56 M16s  | wie FM56, nicht definierte<br>Fusion, temperaturinsensitiv                                                                                                                                                                                                 | diese Arbeit                  |
| FM56 M17s  | wie FM56, <u>hyd::Mu d1</u> ,<br>temperaturinsensitiv                                                                                                                                                                                                      | diese Arbeit                  |
| FM911      | wie M9 $\Delta(\text{fdhH::Mu d1})$ <u>recA</u>                                                                                                                                                                                                            | F. Zinoni                     |

Fortsetzung - Tabelle 1

| Stamm        | Genotyp                                                                                                                                               | Herkunft<br>bzw.<br>Referenz |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| FM911 (pFM3) | wie FM911, mit Plasmid pFM3<br>Plasmid pFM3:<br>- Vektor pACYC184 mit 6 kb<br>BamHI Insert chromosomaler DNA<br>von MC4100 aus der <u>fdhH</u> Region | F. Zinoni                    |

## 2. Medien

Die folgenden Medien wurden verwendet:

### Vollmedien:

LB-Medium: 1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.5 % NaCl  
 TGYES-Medium: 1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.5 % NaCl,  
 0.2 % Glucose

### Minimalmedien:

WM-Medium: 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ,  
 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,  
 10  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  und 1 ml/l Spurenelementlösung

M9-Medium: 0.6 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.3 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 % NaCl,  
 0.1 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$

MOPS-Medium: (Neidhardt et al., 1974)  
 40 mM N-Morpholinopropansulfonsäure, 4 mM  
 Tricine pH 7.5, 0.01 mM  $\text{FeSO}_4$ , 9.75 mM  
 $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $5 \times 10^{-3}$  mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.176 mM  $\text{MgCl}_2$ ,

50 mM NaCl, 0.276 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.32 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Pro Liter Medium wurde 1 ml folgender  
Spurenelementlösung zugegeben:

3 x 10<sup>-3</sup> mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.4 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,  
3 x 10<sup>-2</sup> mM CoCl<sub>2</sub>, 10<sup>-2</sup> mM CuSO<sub>4</sub>, 8 x 10<sup>-2</sup>  
mM MnCl<sub>2</sub>, 10<sup>-2</sup> mM ZnSO<sub>4</sub>.

Feste Nährböden:

- L-Agarplatten (Basalagar zur Herstellung von P1-Lysaten):  
TGYES, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 % Agar
- MacConkey-Agar: 40 g Difco Fertigagar (1.35 % Agar) auf 1 l  
destilliertes Wasser, Kohlenstoffquellen zu 1 % zugesetzt
- L-Weichagar (Top-Agar zur Herstellung von P1-Lysaten):  
TGYES, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.65 % Agar

Supplemente wurden den Medien nach dem Autoklavieren in folgen-  
den Konzentrationen zugegeben:

- Aminosäuren: 40 µg/ml
- Nukleotide: 20 µg/ml
- Vitamine: 5 µg/ml

Kohlenstoffquellen wurden in folgender Konzentration eingesetzt:

|                |        |                  |                  |
|----------------|--------|------------------|------------------|
| aerob: Glucose | 0.4 %  | anaerob: Glucose | 0.4 % bzw. 0.8 % |
| Lactat         | 0.4 %  | Lactat           | 0.8 %            |
| Na-Pyruvat     | 0.8 %  | Na-Pyruvat       | 0.8 %            |
| Glycerin       | 0.87 % | Glycerin         | 0.87 %           |
|                |        | Na-Acetat        | 1 %              |

### 3. Wachstum von Bakterien

#### *3.1 Aerobe Anzucht*

Kleinanbauten von Kulturen wurden aerob in Erlenmeyerkolben in  
einem Wasserbadschüttler (New Brunswick, Modell G76) bei einer  
definierten Temperatur durchgeführt. Das Wachstum der Kultur

wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm oder 600 nm verfolgt (Hitachi 100-20 Spektrophotometer). Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde durch rasches Abkühlen der Kulturen im Eisbad das Wachstum abgebrochen. Die Zellen wurden durch zehnminütige Zentrifugation in einer Sorvall-Kühlenzentrifuge bei 6 000 g gesammelt, mit einem entsprechenden Waschpuffer einmal gewaschen und, falls nicht sofort weiterverarbeitet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Aerobes Wachstum auf Platten erfolgte in Brutschränken (Heraeus).

### 3.2 Anaerobe Anzucht

Anaerobe Anzuchten wurden in Serumflaschen mit 100 ml Nennvolumen bei beliebigem Füllungsgrad durchgeführt. Die Sauerstoffatmosphäre wurde durch dreimaliges Evakuieren und Be-gasen durch reinen Stickstoff ersetzt. Nach dem Autoklavieren wurden C-Quelle, Supplemente und Antibiotika mittels steriler Einmalspritzen zugegeben. Beimpft wurden die Kulturen ebenfalls mit Einmalspritzen (1 ml) normalerweise in einer Verdünnung von 1:100 aus einer Übernachtskultur, die auf demselben Medium angezogen worden war. Beimpfte Agarplatten wurden ebenfalls nach dreimaligem Gasaustausch (Luft gegen 95 %  $\text{N}_2$  + 5 %  $\text{H}_2$ ) in gasdichten Stahlzylindern im  $37^{\circ}\text{C}$  Brutschrank zwei bis drei Tage inkubiert. Um die Aktivität der Hydrogenase- und Formiat-Dehydrogenase zu bestimmen, wurden die Zellen anaerob geerntet. Die anaerobe Zentrifugation wurde in gasdichten Stahlzentrifugenbechern durchgeführt, wobei alle notwendigen Manipulationen in der Anaerobenkammer (Atmosphäre 95 %  $\text{N}_2$  + 5 %  $\text{H}_2$ ) erfolgten. Nicht sofort verwendete Zellen wurden in diesen verschlossenen Zentrifugenbechern bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 4. Herstellen von Rohextrakten

### 4.1 Extrakte für O'Farrell Gelelektrophorese

Die Herstellung der Zellextrakte erfolgte genau nach der von O'Farrell (1975) beschriebenen Methode.

#### 4.2 Zellextrakte für eindimensionale Gelelektrophorese

Der Aufschluß erfolgte durch dreiminütiges Kochen in folgendem Puffer: 80 mM Tris-Cl pH 6.8, 100 mM Dithiothreitol, 2 % SDS und 10 % Glycerin.

Große Zellbestandteile wurden durch kurze Zentrifugation in der Eppendorftischzentrifuge abgetrennt.

#### 4.3 Extraktbereitung beim "pulse-chase" Experiment

Durch Zugabe von gleichem Volumen 20 % Trichloroessigsäure wurde aus 2 ml Zellkultur das Protein ausgefällt. Der Niederschlag wurde anschließend 10 min bei 10 000 g sedimentiert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Präzipitat wurde in 100 µl O'Farrell Sonikationspuffer solubilisiert und genau nach Originalvorschrift weiterbehandelt. Die Ultraschallbehandlung sollte in diesem Fall zum besseren Lösen des Niederschlags beitragen.

### 5. P1 Transduktion der lac-Fusionen

Die Herstellung der P1 Lysate erfolgte nach Lennox (1955). Die Transduktionen wurden im Prinzip nach der von Miller (1972) angegebenen Methode durchgeführt. Um die Ausbeute an Transduktanten zu verbessern, wurde die Bakteriensuspension in zehnfacher Konzentration eingesetzt und mit großen Volumina unverdünntem Lysat inkubiert. Zur Ausprägung der Ampicillin-Resistenz wurden die Zellen, nach erfolgter Phagenadsorption, abzentrifugiert und in 10 ml frischem TGYES-Medium mit 0.1 M Na-Citrat resuspendiert. Nach 60 min Inkubation unter Wachstumsbedingung wurden die Zellen erneut zentrifugiert und auf 1 ml Endvolumen konzentriert. Je 0.2 ml Bakteriensuspension wurden auf MacConkey Agarplatten mit 1 % Lactose und 25 µg/ml Ampicillin ausplattiert.

Kolonien, die Ampicillin resistent und nach aerober Inkubation auf MacConkey Lactoseplatten weiß waren, wurden über Einzelkolonien gereinigt und anschließend verschiedenen physiologischen Tests zur Überprüfung des Phänotyps unterzogen.

## 6. Physiologische Tests

### *6.1 Wachstum auf verschiedenen C-Quellen*

Das anaerobe Wachstum der Fusionsmutanten wurde auf WM-Minimalagarplatten, die verschiedene C-Quellen und Elektronenakzeptoren enthielten, im Vergleich zum Kontrollstamm MC4100 überprüft.

### *6.2 Überprüfung des "Umschaltphänotyps" auf MacConkey Agarplatten*

Je eine Einzelkolonie der verschiedenen Fusionsstämme wurde auf zwei MacConkey Lactoseplatten mit 25 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Eine Platte wurde aerob, die andere anaerob über Nacht bebrütet. Die isolierten Fusionen bildeten aerob weiße und anaerob rote Kolonien.

### *6.3 Test auf Gasbildung*

In Reagenzgläsern, die mit 8 ml LB-Medium, supplementiert mit 0.4 % Glucose, gefüllt waren, wurde jeweils ein umgedrehtes Durham-Röhrchen eingebracht. Nach dem Autoklavieren war dieses vollständig mit Medium gefüllt. 48 h nach Beimpfen und anschließender Inkubation bei 37°C konnte die Auswertung erfolgen. Als positives Ergebnis wurde eine Gasblase, die sich im Durham-Röhrchen gebildet hatte, angesehen.

### *6.4 Test auf benzylviologenabhängige $FDH_H$ -Aktivität*

Der Platten-Test wurde nach der von Mandrand-Berthelot et al. (1978) beschriebenen Methode durchgeführt.

### *6.5 Überprüfung der UV-Sensitivität*

Zur Überprüfung der UV-Sensitivität des Maxizellstammes CSR603 wurde dieser zusammen mit einem Kontrollstamm über Nacht in LB-Medium angezogen und anschließend mit einer Impföse in einem dicken Querbalken auf eine LB-Platte ausgestrichen. Eine Plattenhälfte wurde 5 sek mit UV-Licht bestrahlt (Wellenlänge 254 nm; Intensität 350 W/cm<sup>2</sup>). Nach Inkubation über Nacht war beim Teststamm nur ein Wachstum auf der nicht bestrahlten Hälfte feststellbar.

## 7. Enzymtests

### *7.1 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität*

Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde wie von Miller (1972) beschrieben durchgeführt. Das Wachstum der Zellen wurde grundsätzlich bei einer  $OD_{600}$  von 0.35 bis 0.45 durch Abkühlen im Eisbad abgebrochen. Der Zellaufschluß erfolgte mit einigen Tropfen SDS und Chloroform. Die berechneten  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten sind in relativen Einheiten pro  $OD_{600}$  angegeben.

### *7.2 Hydrogenasetest*

Zur Bestimmung der Hydrogenaseaktivität wurden 100 ml Kultur in Serumflaschen unter Stickstoffatmosphäre zu einer optischen Dichte ( $OD_{420}$ ) von 0.7 angezogen. Die Zellen wurden anaerob über Zentrifugation geerntet und zweimal mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8.5 gewaschen. In 3 ml sauerstofffreiem Tris-Cl Puffer (50 mM, pH 7.6) wurden die Zellen resuspendiert und nach Zugabe von Lysozym zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml und anschließender Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren aufgebrochen. Zum Abbau der DNA wurde DNase in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml zugesetzt. Der Enzymtest wurde in gasdicht verschließbaren Glasküvetten durchgeführt, die folgenden Ansatz enthielten: 2 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8.5, 50  $\mu$ l einer Methylviologenlösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml und 40  $\mu$ l 2-Mercaptoäthanol. Um einen vollständigen Gasaustausch zu erreichen, wurden die Küvetten 15 min mit Wasserstoff begast. Durch Zugabe von 20  $\mu$ l Rohextrakt mit einer Hamiltonspritze wurde die Reaktion gestartet und über die Zunahme der Absorption bei 578 nm bei Raumtemperatur verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde für Methylviologen ein molarer Extinktionskoeffizient von  $9\,000\,M^{-1}\,cm^{-1}$  eingesetzt.

### *7.3 Formiat-Dehydrogenase-Test*

#### *7.3.1 $FDH_H$ Reaktion mit Benzylviologen*

Die benzylviologenabhängige  $FDH_H$  Reaktion wurde im wesentlichen nach der von Lester und DeMoss angegebenen Methode durchgeführt

(Lester und DeMoss, 1971). Statt Argon wurde Stickstoff als Gasatmosphäre verwendet. Die Zugabe von Natriumdithionit wurde durch sorgfältiges Begasen überflüssig.

Bei einem Einelektronenübergang beträgt der molare Extinktionskoeffizient für BV bei 600 nm  $7\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

### 7.3.2 $\text{FDH}_N$ Reaktion mit Phenazinmethosulfat/Dichlorphenolindophenol

Auch die Reduktion von Dichlorphenolindophenol durch die  $\text{FDH}_N$  wurde nach Vorschrift von Lester und DeMoss (1971) durchgeführt. Für die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde hier ein molarer Extinktionskoeffizient von  $21\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  zugrunde gelegt.

Die Anzucht für beide Enzymreaktionen erfolgte auf TGYES-Medium mit  $10\text{ }\mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$  und  $10\text{ }\mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$ .

Zur Induktion der  $\text{FDH}_N$  wurde dem Medium 1 % Kaliumnitrat zugesetzt. Jeweils 100 ml Kulturen wurden in Serumflaschen zu einer optischen Dichte von 0.6 bis 0.7 angezogen, anaerob geerntet und zweimal mit gut entgastem Puffer gewaschen (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.2, 1 mM Dithiothreitol und  $5\text{ }\mu\text{M}$  Selenit). Die Zellen wurden in 1 ml sauerstofffreiem Puffer (50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.2 und 1 mM Dithiothreitol) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte analog der beim Hydrogenasetest beschriebenen Methode.

Für die Benzylviologenreduktion wurden  $20\text{ }\mu\text{l}$  Extrakt eingesetzt, für die Phenazinmethosulfat/Dichlorphenolindophenol-Reduktion  $5\text{ }\mu\text{l}$ .

## 8. Markierungen mit verschiedenen Isotopen

### 8.1 Markierung mit $^{35}\text{S}$ -Sulfat

Als Markierungsmedium wurde das von Neidhardt et al. (1974) beschriebene Mops-Minimalmedium verwendet, dessen Sulfatanteil auf ein Zehntel reduziert wurde. Die aerobe Anzucht erfolgte in Erlenmeyerkolben, die höchstens zu einem Zehntel ihres Nennvolumens gefüllt waren. Anaerobe Kulturen wurden unter Stickstoffatmosphäre in Hungate-Röhrchen gezogen. Radioaktives Sulfat

wurde sofort nach dem Beimpfen des Mediums ( $OD_{420} = 0.05$ ) mit einer Übernachtskultur, die auf dem gleichen Medium gewachsen war, zugegeben. Das Wachstum der Kultur wurde bei einer  $OD_{420}$  von 1 durch rasches Abkühlen unterbrochen.

### 8.2 Differentielle Markierung mit $^3H$ -beziehungsweise $^{14}C$ -L-Leucin

Zur Bestimmung der differenziellen Proteinsynthese unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen wurden zwei Kulturen in Mops-Medium mit 0.4 % Glucose und 12  $\mu g/ml$  L-Leucin angezogen. Zur aeroben Kultur wurde  $^3H$ -Leucin (25  $\mu Ci/ml$ ), zur anaeroben  $^{14}C$ -Leucin (5  $\mu Ci/ml$ ) sofort nach dem Beimpfen ( $OD_{420} = 0.05$ ) zugegeben. Nach Erreichen einer  $OD_{420}$  von 1 wurde das Wachstum unterbrochen und beide Kulturen im Verhältnis 1:1 gemischt. Dieses Gemisch wurde nach der üblichen O'Farrell-Vorschrift für die zweidimensionale Gelelektrophorese vorbereitet.

Analoge Experimente wurden durchgeführt mit Kulturen, die aerob auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen wie Lactat (0.8 %) und Glucose (0.4 %) angezogen wurden. In diesem Fall wurde die auf Lactat gezogene Kultur mit  $^3H$ -Leucin, die auf Glucose mit  $^{14}C$ -Leucin markiert.

Die Bestimmung der Synthese der PFL im plasmidtragenden Stamm KL19 p29 im Vergleich zum Kontrollstamm KL19 pACY184 erfolgte auf ähnliche Weise. Jeweils zwei Parallelkulturen wurden nach aerober Anzucht auf Glucose (beziehungsweise Lactat) sowie anaerober Anzucht auf Glucose im Verhältnis 1:1 gemischt und der daraus erhaltene Zellextrakt auf O'Farrell-Gelen aufgetrennt. Der p29-tragende Stamm wurde dabei mit  $^3H$ -Leucin markiert, der Vergleichsstamm mit dem Vektorplasmid mit  $^{14}C$ -Leucin. Zur Aufrechterhaltung der Plasmide wurden dem Anzuchtmedium jeweils 20  $\mu g/ml$  Chloramphenicol zugegeben.

Das  $^3H/^{14}C$ -Verhältnis des einzelnen Proteins, relativ zu dem des gesamten Zellproteins, wurde nach Fröhler et al. (1980) bestimmt; es ermöglicht eine Aussage über die individuelle Regulation des entsprechenden Proteins unter den getesteten physiologischen Bedingungen.

### 8.3 Markierung mit $^{35}\text{S}$ -L-Methionin im "pulse-chase" Experiment

Stamm KL19 p29 wurde in Mops-Minimalmedium mit 0.4 % Glucose und 20  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol anaerob zu einer  $\text{OD}_{420}$  angezogen. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit einer Hamiltonspritze radioaktives  $^{35}\text{S}$ -L-Methionin zugegeben (20  $\mu\text{Ci/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ). Nach 6 min wurde durch Zugabe eines großen Überschusses an nicht markiertem L-Methionin (200  $\mu\text{g/ml}$ ) die Radioaktivität ausverdünn. Jeweils 2 ml Proben wurden zu folgenden Zeiten nach Zugabe der nicht markierten Aminosäure genommen: 0 min, 15 min, 30 min, 60 min und 120 min. Die Proben wurden in gleiche Volumina 20%ige eisgekühlte Trichloressigsäure pipettiert. Die Probenbereitung erfolgte nach bereits beschriebener Methode.

### 8.4 Markierung mit $^{75}\text{Se}$ -Selenit

Die Markierung der Selenopeptide der Formiat-Dehydrogenasen aus *E. coli* mit  $^{75}\text{Se}$ -Selenit wurde im Prinzip nach der Methode von Cox et al. (1981) durchgeführt.

Die Stämme wurden dazu in TGYES-Medium unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre angezogen. Zur Induktion der Synthese des Selenopeptids der  $\text{FDH}_\text{N}$  des Wildtyps wurde Kaliumnitrat zu 1 % Endkonzentration zugesetzt. Bei den Untersuchungen zur Regulation der Synthese des verkürzten Peptids wurde dagegen Kaliumnitrat in einer Konzentration von 20 mM verwendet; Na-Formiat (pH 7) wurde ebenfalls zu 20 mM zugesetzt.

Das radioaktiv markierte  $^{75}\text{Se}$  (Na-Selenit) hatte eine spezifische Aktivität von 787  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ . Es wurde für die Markierungsversuche in einer Endkonzentration von 0.635  $\mu\text{M}$  verwendet.

Der Zellaufschluß (Zellen aus 3 ml Kultur) erfolgte aerob durch dreiminütiges Kochen in 200  $\mu\text{l}$  Resuspensionspuffer (80 mM Tris-Cl pH 6.8, 100 mM Dithiothreitol, 2 % SDS und 10 % Glycerin).

## 9. Bestimmung der eingebauten Radioaktivität

### 9.1 Bestimmung der Radioaktivität im Gesamtzellprotein

Zur Bestimmung der Radioaktivität im Gesamtprotein wurden 10  $\mu\text{l}$

Extrakt mit 0.5 ml Rinderserumalbumin (1 mg/ml) gemischt und 20 min bei 90°C in 2 ml 10 % Trichloressigsäure inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Filtration auf Glasfaserfiltern gesammelt und gewaschen. Nach dem Trocknen der Filter wurden 5 ml eines Szintillationscocktails aus Toluol mit 0.5 % PPO zugegeben und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer MR 300 (Kontron) bestimmt.

#### *9.2 Messung der Radioaktivität in einzelnen Proteinen*

Hierzu mußte zunächst die Position des einzelnen Proteins unter Zuhilfenahme des zugehörigen Autoradiogramms genau bestimmt werden. Der entsprechende Bereich wurde dann mit einer schmalen zugeschliffenen Kanüle aus dem getrockneten und gefärbten Gel ausgestochen. Die Gelstückchen wurden über Nacht in 100 µl destilliertem Wasser gequollen. Nach Zugabe von 5 ml einer Mischung aus Lipoluma/Lumasolve (LKB) konnte nach drei Tagen die Radioaktivität bestimmt werden. Die Zählung wurde nach weiterer zweitägiger Inkubation wiederholt.

### 10. Elektrophoretische Methoden

#### *10.1 Zweidimensionale Elektrophorese*

Die markierten Zellen wurden nach dem von O'Farrell beschriebenen Verfahren aufgebrochen und die Proteine zweidimensional aufgetrennt (O'Farrell, 1975; O'Farrell et al., 1977).

#### *10.2 Eindimensionale Gelelektrophorese*

Die eindimensionale Auftrennung erfolgte auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS genau nach den Angaben von Laemmli (1970). Bromphenolblau diente als Anzeiger für die Elektrophoresefront.

#### *10.3 Agarose Gelelektrophorese*

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente aus der p29 Plasmid-DNA Analyse erfolgte auf 1.2%igen horizontalen Agarosegelen in folgendem Puffer: 90 mM Tris-Cl pH 8.3, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA.

Nach Anfärben der DNA mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid wurden die einzelnen Banden unter UV-Licht unter Benutzung eines Rotfilters fotografiert. Die Fragmentgröße konnte anhand vergrößerter Fotos mit  $\lambda$  DNA als Längenstandard bestimmt werden.

### 11. Färben der Gele und Autoradiographie

Alle Gele wurden über Nacht in einer Lösung aus 50 % Äthanol, 1 % Trichloressigsäure, 7.5 % Essigsäure und 0.005 % Coomassieblau fixiert, anschließend eine halbe Stunde in der gleichen Lösung, jedoch ohne Alkohol, gefärbt und in 7.5 % Essigsäure entfärbt.

Die getrockneten Gele wurden auf einem Kodak XOMat XR5 Röntgenfilm aufgelegt und bei Raumtemperatur exponiert.

### 12. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach Lowry et al. (1951) bestimmt, mit Rinderserumalbumin als Standard.

### 13. Maxizelleexperiment

Stamm SP264 (Strukturgen der PFL auf dem Plasmid p29) wurde dazu bei 37°C in M9-Minimalmedium (Miller, 1972), supplementiert mit 1 % Casaminoäuren und 1 µg/ml B<sub>1</sub>, zu einem Titer von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml angezogen. Eine 12 ml Portion dieser Kultur wurde in einer sterilen Glaspetrischale mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm 10 Sekunden lang in einem Abstand von 50 cm bestrahlt (Intensität 350 W/cm<sup>2</sup>). Eine Stunde nach Bestrahlung wurde dem Medium Cycloserin zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugesetzt. Nach weiteren 6 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und in M9-Medium ohne Supplemente gewaschen. Anschließend wurden sie in einem Drittel des Ausgangsvolumens in frischem M9-Medium mit 0.4 % Glucose, je 50 µg/ml Threonin, Leucin, Prolin, Arginin und 1 µg/ml Vitamin B<sub>1</sub> resuspendiert

und mit  $^{35}\text{S}$ -L-Methionin (5.5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 1415 Ci/mmol) für eine Stunde unter weiterer Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  markiert. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{g/ml}$  nicht radioaktiv markiertem Methionin und rasches Abkühlen im Eisbad wurde die Inkorporation unterbrochen. Die Proben wurden nach der bereits beschriebenen Methode für die Gelelektrophorese nach O'Farrell weiterverarbeitet.

#### 14. Limitierte Proteolyse

Die Zellen wurden dazu anaerob auf Mops-Minimalmedium angezogen und mit  $^{35}\text{S}$ -Sulfat markiert (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ). Aus insgesamt acht parallelen, getrockneten O'Farrell-Gelen wurden die verschiedenen elektrophoretischen Formen der PFL ausgestochen und gesammelt. Der proteolytische Abbau mit Staphylococcus aureus V8 Protease wurde genau nach der Vorschrift von Cleveland et al. (1977) direkt, ohne vorhergehende Extraktion der Polypeptide, während der Elektrophorese durchgeführt. Das Gel-system entsprach im wesentlichen dem bei Laemmli (1970) beschriebenen SDS-Polyacrylamidgel, jedoch mit Zusatz von 1 mM EDTA.

Das getrocknete Gel wurde anschließend einer Autoradiographie unterzogen. Nach etwa zwei Wochen waren Banden auf dem Autoradiogramm sichtbar.

#### 15. Spaltung mit Bromcyan

Die Bromcyanspaltung von  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markiertem Gesamtzell-extrakt wurde nach der Vorschrift von Gross und Witkop (1962) durchgeführt. Dazu wurden die Kulturen nach der bereits beschriebenen Methode markiert und anschließend mit Ultraschall aufgebrochen.

Zur Kalkulation der Proteinkonzentration wurden folgende Werte zugrunde gelegt: 1  $\text{OD}_{420}$  mit  $2 \times 10^8$  Zellen ergibt 80  $\mu\text{g}$  Protein.

Die Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel.

#### 16. Transformation und Restriktionsanalysen

Die Transformation der beiden Plasmide p29 und pACYC184 in KL19 wurde nach der Methode von Cohen et al. (1977) durchgeführt. Die Restriktionsanalyse des Plasmids p29 mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurde genau nach den Angaben der Hersteller ausgeführt.

#### 17. Plasmidisolierung

Die Plasmide p29 und pACYC184 wurden wie bei Clewell und Helinski (1969) beschrieben über CsCl-Gradienten gereinigt.

#### 18. Liste besonderer Chemikalien und Bezugsquellen

Die verwendeten Redoxfarbstoffe wurden von folgenden Firmen bezogen:

|                         |   |                                 |
|-------------------------|---|---------------------------------|
| Methylviologen          | - | EGA-Chemie                      |
| Benzylviologen          | - | Sigma                           |
| Phenazinmethosulfat     | - | Serva Feinbiochemica Heidelberg |
| Dichlorphenolindophenol | - | Serva Feinbiochemica Heidelberg |

Die verwendeten Radiochemikalien stammten von Amersham-Buchler.

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad.

---

## C. ERGEBNISSE

---

### 1. Umstellung der Proteinausstattung fakultativer Organismen beim Übergang von Aerobiose auf Anaerobiose

#### *1.1 Qualitative Untersuchungen*

Untersuchungen an fakultativen Organismen haben gezeigt, daß je nach der Verfügbarkeit von Sauerstoff oder alternativen Elektronenakzeptoren im Medium tiefgreifende Veränderungen in der Zelle stattfinden. Dabei wird nicht nur die Rate, sondern auch der Weg des Kohlenhydratabbaus beeinflusst. Bei dieser physiologischen Umstellung spielen sowohl die Mechanismen der Enzymaktivierung als auch der -Inhibition eine wichtige Rolle (Gray et al., 1966b; Krebs, 1972; Thomas et al., 1972; Sanwal, 1970).

Der Beitrag der Enzymsynthese-Induktion beziehungsweise -Repression zur Anpassung der Zelle an anaerobe Bedingungen ist dagegen noch wenig untersucht. Einen ersten Überblick über die Zahl der unter Aerobiose und Anaerobiose unterschiedlich synthetisierten Proteine haben wir deswegen mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach O'Farrell erarbeitet. Über diese Methode lassen sich aus einem Zellrohextrakt weit über 1 000 Einzelproteine auftrennen und deren individuelle Regulation unter verschiedenen physiologischen Bedingungen untersuchen. Diese Methode bietet zudem den Vorteil, daß man einen Überblick über die bei der betreffenden physiologischen Veränderung ablaufenden Vorgänge erhält.

Zur Analyse der entsprechenden Proteinmuster wurde *E. coli* KL19 unter verschiedenen physiologischen Bedingungen kultiviert und dabei mit  $^{35}\text{S}$ -Sulfat markiert. Die Abbildungen 4 bis 6 zeigen die erhaltenen Elektropherogramme.

Abbildung 4A zeigt das typische Proteinmuster des aerob ge-

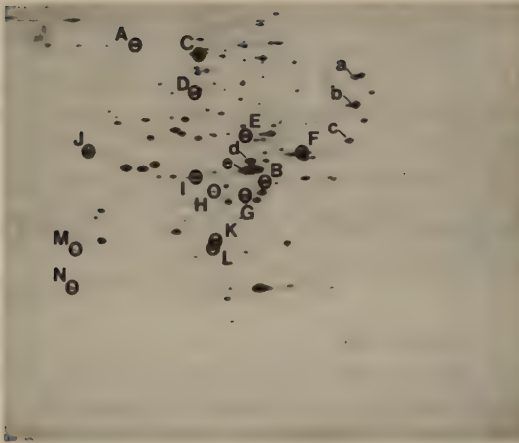


Abbildung 4A:

Aerobes

Wachstum

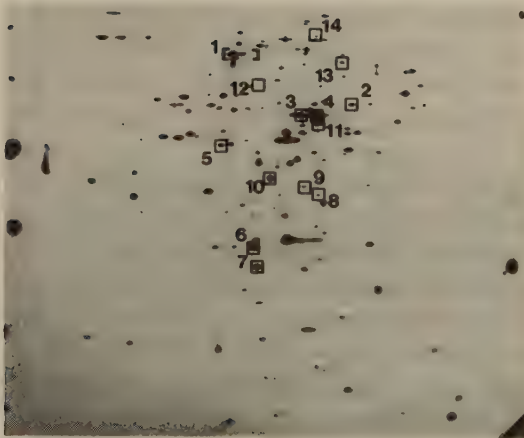


Abbildung 4B:

Anaerobes

Wachstum

Abbildung 4 A und B:

O'Farrell-Auftrennung des  $^{35}\text{S}$ -Sulfat markierten Extraktes von *E. coli* KL19 nach Anzucht auf Mops-Medium mit Glucose als C-Quelle.

Kreise und Großbuchstaben markieren die unter aeroben Anzuchtbedingungen in höherer Rate synthetisierten Proteine.

Proteine, deren Synthese unter anaeroben Wachstumsbedingungen stimuliert wird, sind mit einem Kästchen eingerahmt und nummeriert.

Davon wurden folgende Proteine auf O'Farrell-Gelen bereits

identifiziert:

Aerobe Proteine:

A:  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase; B:  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-Coenzym A-Synthetase; C: Tetrahydropteroyltri-glutamat-Transmethylase

Anaerobe Proteine:

1: Pyruvat-Formiat-Lyase; 10: Phosphofruktokinase I

Mit Kleinbuchstaben und Pfeil sind identifizierte Vergleichs-proteine gekennzeichnet:

a: ribosomales Protein S1; b: *groE*-Genprodukt; c: ATPase,  $\beta$ -Untereinheit; d: Enolase; e: Elongationsfaktor Tu

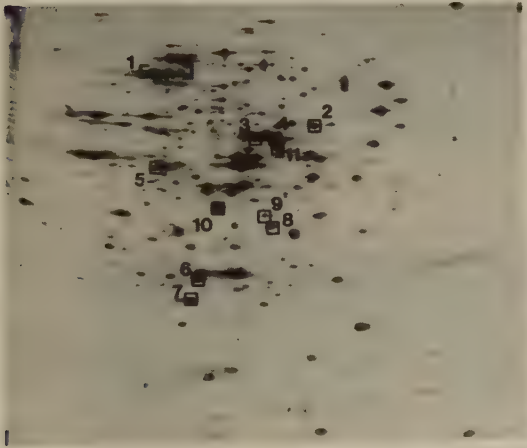


Abbildung 5:

Zweidimensionale Auftrennung des Extraktes von *E. coli* KL19 nach anaerober Anzucht auf Pyruvat.  
Wie in Abb. 4B sind typisch "anaerobe" Proteine mit einem Kästchen umrandet.

Figure 1. A. 100x magnification.

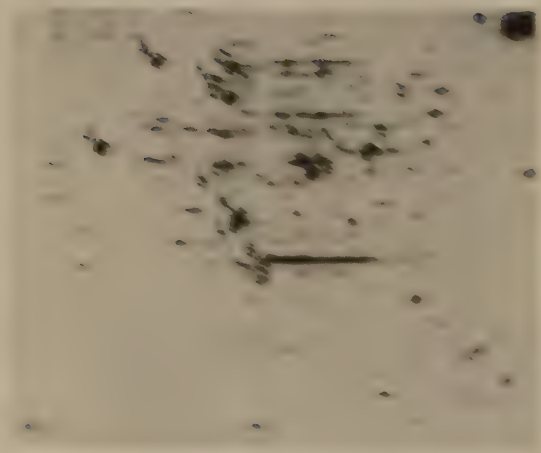


Figure 1. A. 100x magnification.  
B. 100x magnification.  
C. 100x magnification.  
D. 100x magnification.



Figure 1. B. 100x magnification.  
C. 100x magnification.  
D. 100x magnification.

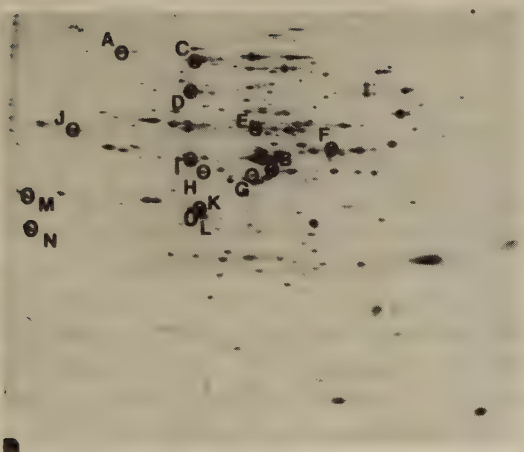


Abbildung 6C:  
Aerobe Anzucht  
auf Lactat

Abbildung 6 A, B und C:

Zweidimensional aufgetrennter Extrakt von *E. coli* KL19 nach Anzucht mit Lactat als C-Quelle.

Kreise und Großbuchstaben markieren die unter aeroben Anzuchtbedingungen in höherer Rate synthetisierten Proteine. Proteine, deren Synthese unter anaeroben Wachstumsbedingungen stimuliert wird, sind mit einem Kästchen eingerahmt und numeriert.

Davon wurden folgende Proteine auf O'Farrell-Gelen bereits identifiziert:

Aerobe Proteine:

- A:  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase
- B:  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-Coenzym A-Synthetase
- C: Tetrahydropteroyltriglutamat-Transmethylase

Anaerobe Proteine:

- 1: Pyruvat-Formiat-Lyase
- 10: Phosphofruktokinase I

zogenen, Abbildung 4B das des anaerob kultivierten Stammes. Als Kohlenstoffquelle wurde in beiden Fällen Glucose eingesetzt.

Das Elektropherogramm, das bei anaerober Anzucht mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle erhalten wurde, ist in Abbildung 5 dargestellt.

In Abbildung 6A, B und C sind die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von Kulturen, die mit Lactat als Kohlenstoffquelle angezogen wurden, aufgezeigt. Hier wurden der anaeroben Anzucht 40 mM Kaliumnitrat (Abb. 6A) beziehungsweise Fumarat (Abbildung 6B) zugesetzt. (Lactat gehört zu den nicht fermentierbaren Substraten und kann von *E. coli* anaerob nicht ohne externen Elektronenendakzeptor abgebaut werden.)

Nach optischen Kriterien wurden nun auf dem Gel der aerob auf Glucose angezogenen Kultur diejenigen Proteine markiert, die unter den gewählten Wachstumsbedingungen im Vergleich zur anaerob gewachsenen neu erscheinen, beziehungsweise deren Synthese stark stimuliert wird. Die elektrophoretische Auftrennung des aeroben Extraktes zeigte in 14 Polypeptiden deutliche Abweichungen zur entsprechenden anaeroben Kultur (siehe Abb. 4A). Darunter befinden sich zwei Enzyme des Zitronensäurezyklus, die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (Protein A) und die  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-Coenzym A-Synthetase (Protein B). Protein C wurde als die Tetrahydropteroyltriglutamat-Transmethylase identifiziert (Phillips et al., 1980; Smith und Neidhardt, 1983). Über die Identität der anderen Peptide liegen bis jetzt noch keine Daten vor.

Unter Anaerobiose wurden 14 Polypeptide gefunden, die Unterschiede zur aeroben Vergleichskultur aufwiesen (Abb. 4B). Dabei handelt es sich bei Protein Nr. 10 um die Phosphofruktokinase I (Pedersen et al., 1978; Phillips et al., 1980; Bloch et al., 1980). Die anderen markierten Proteine wurden bisher noch nicht auf O'Farrell-Gelen identifiziert.

Eine ähnliche Analyse der Proteilmuster mit identischen Resultaten wurde gleichzeitig im Labor von Neidhardt (Smith und Neidhardt, 1983a; Smith und Neidhardt, 1983b) durchgeführt.

Auf den weiteren Gelen wurden nun die als typisch "aerob" gekennzeichneten Proteine mit einem Kreis umrandet, die "anaeroben" mit einem Kästchen.

Die so durchgeführte Auswertung der zweidimensionalen Auftrennung der Proteine einer anaerob, mit Pyruvat als Energiequelle, angezogenen Kultur ist in Abbildung 5 dargestellt. Markante Unterschiede zum Muster von anaerob auf Glucose gewachsenen Zellen sind nicht erkennbar. Lediglich eine deutliche Stimulation der Synthese von Protein Nr. 1 ist auffällig. In späteren Versuchen konnte dieses Protein als PFL identifiziert werden.

Das typische Proteinmuster einer aerob angezogenen Kultur erhält man mit Lactat als Energiequelle (Abb. 6C), da diese C-Quelle nur respiratorisch abgebaut werden kann.

Auch unter Anaerobiose mit Nitrat als Elektronenakzeptor gleicht das erhaltene Peptidmuster (Abb. 6A) mehr demjenigen einer aeroben Kultur. Typische, nur unter aeroben Bedingungen synthetisierte Polypeptide wie zum Beispiel Protein A, B, C, D und F finden wir auch unter diesen Anzuchtbedingungen, aber auch einige "anaerobe" Proteine werden synthetisiert, zum Beispiel Protein Nr. 1.

Im Gegensatz dazu zeigt die zweidimensionale Auftrennung eines Extraktes von Zellen, die unter den gleichen Bedingungen angezogen wurden, jedoch Fumarat anstelle von Nitrat als Elektronenendakzeptor benutzen (Abb. 6B), eher ein "anaerobes" Proteinmuster. Auffallend ist, daß die typisch "anaeroben" Polypeptide mit hoher Rate synthetisiert werden, zum Beispiel Proteine 1, 2, 3 und 4.

## 2. Charakterisierung der Pyruvat-Formiat-Lyase

Die PFL stellt eines der zentralen Enzyme des anaeroben Glucoseabbaues der Enterobakterien dar. Die durch dieses Enzym katalysierte Reaktion ist die anaerobe Alternative zur Reaktion der Pyruvat-Dehydrogenase, über die unter aeroben Bedingungen der Pyruvatabbau läuft (Henning, 1963; Knappe et al., 1972).

Nach den Ergebnissen von Knappe und Schmitt (1976) wird das Enzym in Gegenwart von Sauerstoff reversibel inaktiviert. Um zu überprüfen, ob auch die Synthese des Enzyms durch Sauerstoff beeinflusst wird, mußte die PFL zunächst auf O'Farrell-Gelen identifiziert werden.

### *2.1 Elektrophoretisches Verhalten*

Gereinigte PFL, die von Herrn Knappe zur Verfügung gestellt wurde, zeigte auf O'Farrell-Gelen ein typisches Peptidmuster (Abb. 7).

Die elektrophoretische Trennung liefert zwei Polypeptide, die beide in verschiedenen Ladungsisomeren auftreten. Die absolute Menge dieser isomeren Formen nimmt zur "sauren" Gelseite hin ab. Nach dem in der Literatur angegebenen Molekulargewichtsstandard auf O'Farrell-Gelen (Bloch et al., 1980) liegt das Molekulargewicht bei etwa 80 Kd, wobei die  $\alpha$ -Untereinheit etwas größer ist als die  $\beta$ -Untereinheit. Der exakte Wert für das native Enzym, korrigiert anhand von Sequenzdaten, liegt bei 170 Kd (Knappe, persönliche Mitteilung, 1982).

Relativ zu den meisten anderen Zellproteinen ist die PFL auf der linken, also mehr basischen Seite, des Gelsystems lokalisiert.

### *2.2 Identifizierung als anaerob induziertes Enzym*

Wie nun ein Vergleich mit den vorher erstellten Elektrophogrammen zeigt (Abb.4A und B), wird unter Anaerobiose ein prominentes Protein mit identischem Laufverhalten (Protein Nr. 1 auf Abb.4B) induziert. Durch Comigration des gereinigten Enzyms



Abbildung 7:

Zweidimensionale Auftrennung der gereinigten Pyruvat-Formiat-Lyase. Die verschiedenen Untereinheiten und Ladungsisomeren sind numeriert.

- 1:  $\alpha$ -Untereinheit
- 2:  $\beta$ -Untereinheit
- 3 und 5: Ladungsisomere der  $\alpha$ -Untereinheit
- 4 und 6: Ladungsisomere der  $\beta$ -Untereinheit

wurde bewiesen, daß Protein Nr. 1 (Abb.4B) identisch ist mit gereinigter PFL. Damit konnte ein zentrales Enzym des anaeroben Stoffwechsels von E. coli erstmals auf O'Farrell-Gelen identifiziert werden.

#### 2.5 Quantitative Bestimmung der steady-state Konzentrationen der PFL und weiterer Polypeptide, deren Synthese durch Sauerstoff reguliert wird

Um eine quantitative Aussage über die Menge der unter bestimmten physiologischen Bedingungen synthetisierten Proteine machen

zu können, wurde eine differenzielle Markierung der Kulturen mit  $^3\text{H}$ - beziehungsweise  $^{14}\text{C}$ -Leucin bei steady state Wachstum unter zwei verschiedenen Wachstumsbedingungen durchgeführt; nach anschließender elektrophoretischer Auftrennung des Extraktgemisches läßt sich über Bestimmung des  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses des einzelnen Proteins im Vergleich zu dem des Gesamtproteins die relative Synthesemenge messen.

Diese Analyse bietet dabei mehrere Vorteile:

- Es wird über eine chemische Methode quantifiziert, die unabhängig ist von der Stabilität beziehungsweise vom Aktivitätszustand des einzelnen Proteins.
- Alle Messungen können am selben Extrakt durchgeführt werden, beruhen also auf exakt den gleichen Voraussetzungen und sind somit in idealer Weise vergleichbar.
- Im Gegensatz zu klassischen Methoden ist die Reproduzierbarkeit und Meßgenauigkeit hier wesentlich höher.

In Tabelle 2, Spalte 1, ist das  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis einer Reihe von Proteinen, die auf Abbildung 4A und B markiert wurden, aufgelistet. In diesem Fall wurde die aerob auf Glucose gewachsene Kultur mit  $^3\text{H}$ -Leucin markiert und mit einer entsprechenden anaeroben,  $^{14}\text{C}$ -Leucin markierten Kultur gemischt.

Wie den Werten zu entnehmen ist, werden die nach den  $^{35}\text{S}$ -Sulfat markierten Gele als "anaerob induziert" eingestuften Proteine unter Anaerobiose tatsächlich in verstärktem Maße synthetisiert. Das Ausmaß der Regulation ist jedoch nicht sehr stark, es beläuft sich auf das Zwei- bis Vierfache. Die PFL (Protein Nr. 1) liegt nach diesen Ergebnissen in anaeroben Zellen in vierfach größerer Menge als in aeroben vor. Bei Anzucht auf Lactat sinkt der aerobe Grundspiegel der PFL nochmals um etwa ein Viertel gegenüber der auf Glucose gewachsenen Kultur ab. Neben diesen anaeroben Proteinen wurden noch die relativen Synthesemengen zweier typisch aerober Polypeptide

Tabelle 2: Synthesemenge der PFL und einiger Vergleichspro-  
teine bei steady-state Wachstum unter aeroben und  
anaeroben Wachstumsbedingungen in *E. coli* KL19

| Protein                            | Nomen-<br>klatur<br>in<br>Abb. 4A<br>und<br>Abb. 4B | $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ des Einzelproteins im<br>Verhältnis zum Gesamtprotein |                     |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                    |                                                     | Glucose<br>(aerob)                                                               | D-Lactat<br>(aerob) |
|                                    |                                                     | Glucose<br>(anaerob)                                                             | Glucose<br>(aerob)  |
| Ribosomales Protein S1             | a                                                   | 1.46                                                                             | 1.33                |
| <u>groE</u> -Genprodukt            | b                                                   | 0.97                                                                             | 1.01                |
| ATPase, $\beta$ -Untereinheit      | c                                                   | 1.19                                                                             | 1.23                |
| Enolase                            | d                                                   | 0.51                                                                             | 0.98                |
| Elongationsfaktor Tu               | c                                                   | 1.19                                                                             | 1.23                |
| $\alpha$ -Ketoglutarat-            |                                                     |                                                                                  |                     |
| Dehydrogenase                      | A                                                   | 2.4                                                                              | n.b. <sup>a</sup>   |
| Succinyl-CoA-Synthetase            |                                                     |                                                                                  |                     |
| ( $\beta$ -Untereinheit)           | B                                                   | 4.2                                                                              | 1.52                |
| Pyruvat-Formiat-Lyase <sup>b</sup> |                                                     |                                                                                  |                     |
|                                    | 1                                                   | 0.26                                                                             | 0.77                |
|                                    | 2                                                   | 0.35                                                                             | 0.66                |
|                                    | 3                                                   | 0.24                                                                             | 0.34                |
| nicht identifizierte               | 4                                                   | 0.25                                                                             | 0.52                |
| "anaerobe"                         | 5                                                   | 0.35                                                                             | 0.69                |
| Proteine                           | 6                                                   | 0.53                                                                             | 0.87                |
|                                    | 7                                                   | 0.54                                                                             | 0.41                |

<sup>a</sup> n.b. = nicht bestimmt

<sup>b</sup> Radioaktivität, die in allen sechs isomeren Formen der PFL  
gemessen wurde

bestimmt, ebenso die einer Reihe von Vergleichsproteinen, deren Identität und Position auf zweidimensionalen Gelen bekannt ist. Bei den beiden ausgewählten aeroben Proteinen handelt es sich um zwei Enzyme des Zitronensäurezyklus, die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase und die  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-Coenzym A-Synthetase. Sie liegen unter aeroben Bedingungen in einem bis zu fünffach höherem Spiegel vor.

Als Vergleichsproteine wurden verwendet: ribosomales Protein S1, groE Genprodukt,  $\beta$ -Untereinheit der ATPase, Enolase und Elongationsfaktor Tu. Sie werden unter den angelegten Bedingungen in etwa gleicher Menge synthetisiert. Die geringen Unterschiede sind darauf zurückzuführen, daß einige dieser Proteine, zum Beispiel S1, eine Abhängigkeit ihrer Synthese von der Wachstumsrate aufweisen.

Eine Ausnahme bildet das Glycolyseenzym Enolase, das unter Anaerobiose in zweifacher Menge vorliegt.

#### *2.4 Aufklärung der Untereinheitenstruktur*

Auf den Elektropherogrammen war auffällig, daß die relativen Mengen der beiden postulierten, verschieden großen Untereinheiten des Enzyms (Knappe et al., 1974) in den verschiedenen Experimenten variierten. Ob es sich dabei um Modifikationen des Enzyms oder um Proteolyse an einer bevorzugten, exponierten Stelle des  $\alpha$ -Peptids (Formen 1, 3, 5), aus dem schließlich das  $\beta$ -Peptid (Formen 2, 4, 6) hervorgeht, handelte, blieb zu überprüfen.

Dazu wurden folgende Experimente durchgeführt:

##### *2.4.1 Pulse chase Experiment*

Eine anaerobe Kultur wurde mit  $S^{35}$ -Methionin markiert; zu einem definierten Zeitpunkt wurde die Radioaktivität mit einem Überschuß an unmarkiertem Methionin ausverdünnt.

Der zeitliche Verlauf der Verteilung der Markierung in den elektrophoretischen Formen Nr. 1 und 2 der PFL (Nomenklatur siehe Abb. 7) ist in Abbildung 8 dargestellt.

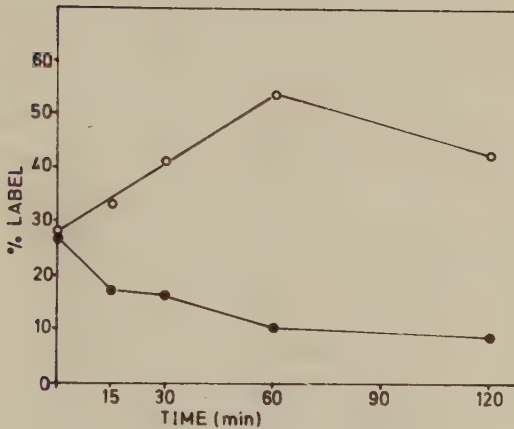


Abbildung 8:

Kinetik der Markierung der beiden elektrophoretischen Formen 1 und 2 (Abb. 7) der PFL in einem pulse chase Experiment. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die Radioaktivität, die in allen sechs isomeren Formen (siehe Abb. 7) des Enzyms gemessen wurde. Zum Zeitpunkt 0 wurde unmarkiertes Methionin zugegeben.

Die in die größere Polypeptidkette eingebaute Radioaktivität nahm demnach relativ rasch ab, während sie in der kleineren zunächst zunahm, um erst nach 60 min ebenfalls leicht abzunehmen. Dieses Abwandern der eingebauten Radioaktivität spricht für eine Konversion der  $\alpha$ -Untereinheit in die  $\beta$ -Untereinheit.

#### 2.4.2 Limitierte Proteolyse

Ein unterschiedliches Laufverhalten zweier Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel schließt deren Identität grundsätzlich nicht aus. Einfache chemische Modifikation, Synthese eines Vorläuferproteins oder artifizielle Proteolyse während der Extraktbereitung sind mögliche Gründe dafür. Die verwandt-

schaftliche Beziehung zweier Proteine läßt sich nur eindeutig über einen Vergleich des Peptidmusters nach proteolytischem Abbau klären. Cleveland und Mitarbeiter beschrieben 1977 eine einfache Methode, mit deren Hilfe auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine bei erneuter Elektrophorese mit Protease behandelt werden. Zur Aufklärung der Untereinheitenstruktur der PFL war eine solche Analyse (limitierte Proteolyse) gut geeignet.

Zu diesem Zweck wurde eine anaerobe Kultur von KL19 mit  $^{35}\text{S}$ -Sulfat markiert und die Proteine des erhaltenen Extrakts zweidimensional aufgetrennt. Aus acht parallelen Gelen wurden die einzelnen Flecken der PFL (Nr. 1 bis 6) getrennt ausgestochen und gesammelt. Die Behandlung mit *Staphylococcus aureus* V8 Protease erfolgte wie von Cleveland et al. (1977) beschrieben. Die durch den proteolytischen Abbau erzeugten Polypeptide wurden über Elektrophorese in 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Abbildung 9 zeigt das erhaltene Autoradiogramm.

Wie ein Vergleich des erhaltenen Peptidmusters der  $\alpha$ -Untereinheit (Spur 1) mit dem der  $\beta$ -Untereinheit (Spur 2) zeigt, treten in beiden Fällen eine Reihe von identischen Spaltprodukten auf. Dieser Befund spricht dafür, daß beide Proteine in wesentlichen Bereichen identisch sind und ihr unterschiedliches Molekulargewicht demnach auf proteolytischem Abbau beruht. Die Ladungsisomeren der beiden Untereinheiten liefern ein exakt gleiches Peptidmuster.

Die geschilderten Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß PFL eine  $\alpha_2$  Untereinheitenstruktur besitzt. Der variable Anteil eines kürzeren Polypeptids ist auf Proteolyse zurückzuführen.

#### *2.5 Identifizierung des Strukturgens der PFL auf dem Plasmid p29*

Die weiteren Untersuchungen zur Gendosisabhängigkeit der Synthese der PFL wurden mit Hilfe eines Plasmids durchgeführt, das das Strukturgen der PFL trägt. Dieses Plasmid wurde von

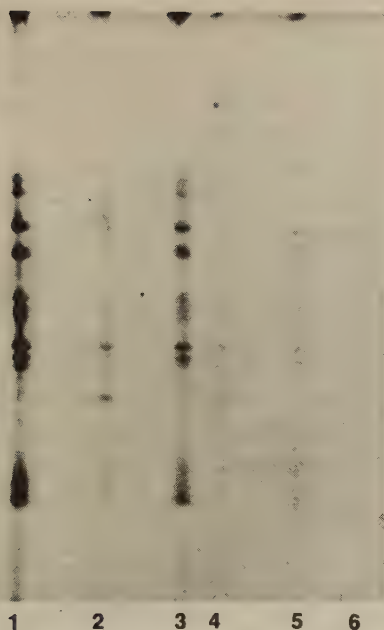


Abbildung 9:

*Limitierte Proteolyse mit Staphylococcus aureus V8 Protease der verschiedenen elektrophoretischen Formen der PFL. Bezeichnung der einzelnen Isomeren wie in Abb. 7 angegeben.*

Christiansen und Pedersen zur Verfügung gestellt. Diese Autoren hatten einen transduzierenden  $\lambda$ -Phagen  $\lambda_{aspC2}$  beschrieben (Christiansen und Pedersen, 1981), der für das Strukturgen des ribosomalen Proteins S1 und für drei weitere Polypeptide mit Molekulargewichten von 80, 26 und 20 Kd kodiert.

Wegen des Auftretens einer zusätzlichen verkürzten Kette, wurde das 80 Kd Polypeptid von ihnen als Membranprotein mit entsprechendem Leaderpeptid angesehen. Es wurde zusammen mit dem Gen für das 26 Kd Protein in pACYC184 subkloniert. Dieser Klon wird im weiteren Verlauf als p29 bezeichnet.

Die Restriktionskarte von Plasmid p29 ist in Abbildung 10 gezeigt.

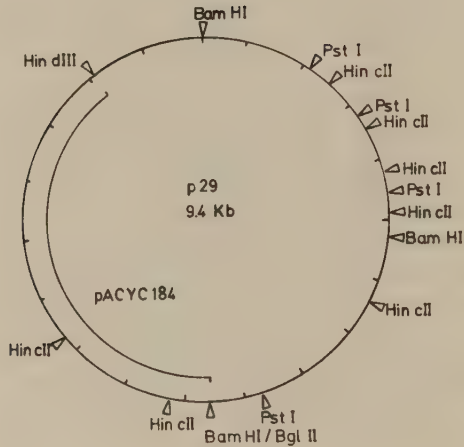


Abbildung 10:

*Restriktionskarte von Plasmid p29. Der innere Halbkreis gibt Position und Größe des Vektorplasmids pACYC184 an. Die Abstandsmarkierungen entsprechen 0.5 Kilobasen. Die Schnittstellen HindII und BamHI markieren die Insertionsstellen des klonierten Genabschnitts in das Vektorplasmid.*

Da das Strukturgen für die PFL in der Nähe des Gens aspC2 liegt (Varenne et al., 1975), und da das 80 Kd Peptid ein ähnliches elektrophoretisches Verhalten zeigte (Christiansen und Pedersen, 1981) wie die von uns auf O'Farrell-Gelen lokalisierte PFL (Abb.4B), wurde überprüft, ob das von p29 kodierte 80 Kd Polypeptid identisch mit der PFL ist.

### *2.5.1 Synthese der auf p29 kodierten Polypeptide im Maxizellsystem*

Zur Analyse der auf p29 liegenden Gene wurde eine von Sancar und Mitarbeiter (1979) beschriebene Methode angewendet, die eine bevorzugte Synthese plasmidkodierter Proteine ermöglicht. Dazu wurde Plasmid p29 in den UV-sensitiven Stamm CSR603 (Sancar et al., 1979) transformiert. Eine Kultur dieses Stammes wurde nach Anzucht auf Minimalmedium in der exponentiellen Wachstumsphase mit UV-Licht bestrahlt. Durch diese Behandlung wird vor allem chromosomale DNA stark geschädigt und schließlich abgebaut, während die DNA kleiner Plasmide relativ uneinträchtigt bleibt. Die im Maxizellsystem von p29 synthetisierten Polypeptide (Abb. 11) wurden zweidimensional nach O'Farrell aufgetrennt und einer Co-Elektrophorese mit gereinigter PFL unterzogen.



Abbildung 11:

Autoradiogramm einer O'Farrell Auftrennung der von p29 kodierten Polypeptide nach Markierung im Maxizellsystem.

Die synthetisierten Polypeptide sind:

1 - PFL; 2 - Chloramphenicolacetyltransferase. Bei Polypeptid Nr. 3 handelt es sich um background Markierung im Elongationsfaktor Tu.

Die mit Coomassie gefärbten Proteinflecken der PFL deckten sich genau mit Protein Nr. 1 aus dem Maxizellexperiment. Daraus kann entnommen werden, daß das von p29 kodierte Genprodukt identisch ist mit der PFL.

#### 2.5.2 Limitierte Proteolyse

Der endgültige Beweis dafür wurde durch limitierte Proteolyse erbracht. Die unter anaeroben Anzuchtbedingungen synthetisierte PFL und das im Maxizellsystem synthetisierte Polypeptid lieferten im limitierten proteolytischen Abbau durch *Staphylococcus aureus* V8 Protease gleiche Spaltprodukte (Daten nicht gezeigt).

#### 2.6 Untersuchungen zur Gen-Dosis-Abhängigkeit der PFL Synthese

Um zu überprüfen, ob die Synthese der PFL abhängig ist von der Kopienzahl seines Strukturgens in der Zelle, wurden Plasmid p29 und der Vektor pACYC184 in Stamm *E. coli* KL19 transformiert. Das Plasmid pACYC184 gehört zur Gruppe der Plasmide, die in hoher Kopienzahl in der Zelle vorkommen (Chang und Cohen, 1978). Mit diesen Stämmen wurden in analoger Weise Experimente zur Quantifizierung der steady-state Konzentration der PFL durchgeführt, wie sie unter 2.3 beschrieben sind.

Wie man aus Tabelle 3 ersehen kann, war im p29 tragenden Stamm die Menge der PFL bei aerober Anzucht 14-fach, unter anaeroben Bedingungen 11-fach, gegenüber dem Vergleichsstamm KL19 pACYC184 erhöht. Der relative Anteil der fünf Vergleichsproteine und der beiden aeroben Proteine ist im plasmidhaltigen Stamm generell niedriger, was auf den außerordentlich hohen Anteil der PFL am Gesamtprotein zurückzuführen ist (siehe Abb. 12).

Aus dem Anteil der Markierung in PFL Polypeptid (Abb. 12) relativ zu der im Gesamtprotein ergab sich, daß bis zu 30 % des

Tabelle 3: Expression der Pyruvat-Formiat-Lyase in Stamm KL19 p29 relativ zu der in Stamm KL19 pACYC184

| Protein                                             | Nomen-<br>klatur<br>in<br>Abb. 4A<br>und<br>Abb. 4B | $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ des Einzelproteins im<br>Verhältnis zum Gesamtprotein |                      |                     |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|
|                                                     |                                                     | Glucose<br>(aerob)                                                               | Glucose<br>(anaerob) | D-Lactat<br>(aerob) |
| Ribosomales Protein S1                              | a                                                   | 0.90                                                                             | 0.59                 | 0.89                |
| groE-Genprodukt                                     | b                                                   | 0.89                                                                             | 0.55                 | 0.69                |
| ATPase, $\beta$ -Untereinheit                       | c                                                   | 0.73                                                                             | 0.61                 | 0.57                |
| Enolase                                             | d                                                   | 0.73                                                                             | 0.54                 | 0.72                |
| Elongationsfaktor Tu                                | e                                                   | 0.83                                                                             | 0.66                 | 0.64                |
| $\alpha$ -Ketoglutarat-<br>Dehydrogenase            | A                                                   | 0.91                                                                             | n.b. <sup>a</sup>    | 0.75                |
| Succinyl-CoA-Synthetase<br>( $\beta$ -Untereinheit) | B                                                   | 0.80                                                                             | n.b. <sup>a</sup>    | 1.0                 |
| Pyruvat-Formiat-Lyase <sup>b</sup>                  | 1                                                   | 14.5                                                                             | 11.0                 | 33                  |
| nicht identifizierte<br>"anaerobe"<br>Proteine      | 3                                                   | 0.59                                                                             | 0.38                 | 0.28                |
|                                                     | 4                                                   | 0.81                                                                             | 0.44                 | 0.24                |
|                                                     | 5                                                   | 0.76                                                                             | 0.46                 | 0.60                |
|                                                     | 6                                                   | 0.63                                                                             | 0.51                 | n.b. <sup>a</sup>   |
|                                                     | 7                                                   | 0.61                                                                             | 0.32                 | n.b. <sup>a</sup>   |

<sup>a</sup> n.b. = nicht bestimmt

<sup>b</sup> Radioaktivität, die in allen sechs isomeren Formen der PFL gemessen wurde

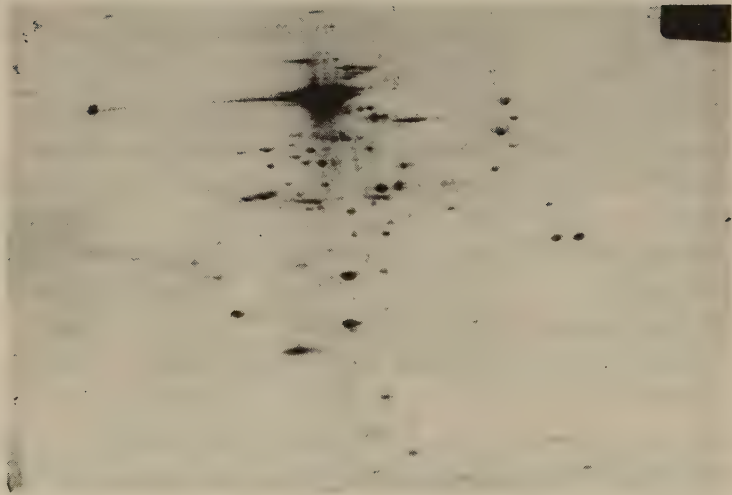


Abbildung 12:

Zweidimensionale Auftrennung eines Extraktes  
von *E. coli* KL19 p29.

Der Stamm wurde anaerob auf Glucose Minimal-  
medium angezogen und 6 min mit  $S^{35}$ -Methionin  
pulsmarkiert. Auf dem coomassiegefärbten Gel  
waren die verschiedenen isomeren Formen der  
PFL gut zu unterscheiden.

löslichen Gesamtzellproteins von der PFL gestellt werden. Im nicht plasmidhaltigen Stamm KL19 bildet die PFL zirka 3 % des löslichen Zellproteins. Diese Werte stehen im Einklang mit den über Enzymaktivität bestimmten Mengen (Knappe, persönliche Mitteilung).

### 3. Untersuchung zur Regulation anaerob induzierter Enzymsysteme anhand von lac-Fusionsstämmen

Um Einblick in den Mechanismus zu erhalten, über den die Synthese anaerob synthetisierter Enzyme kontrolliert wird, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit sogenannte lac-Fusionsstämmen isoliert und analysiert. Lac-Fusionsstämmen eignen sich in hervorragender Weise zu diesen Regulationsstudien. In solchen Stämmen wird der Phage Mu d1 (Casadaban und Cohen, 1979), der das Strukturgen der  $\beta$ -Galaktosidase lacZ trägt, in ein Gen, zum Beispiel ein anaerob induziertes, inseriert. Da dem lacZ Gen eine eigene Promotor-Operatorregion fehlt, erfolgt die Transkription über die Transkriptionsstartsignale des fusionierten Gens. Durch die Insertion des Phagen wird das betreffende Gen inaktiviert; solche "insertionelle" Mutationen können dann durch verschiedene physiologische Untersuchungen charakterisiert und auch lokalisiert werden. Die Regulation solcher fusionierter Gene kann weiterhin auf einfache Weise über die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität untersucht werden. Auf oft recht aufwendige Enzymtests, zum Beispiel unter anaeroben Bedingungen, kann verzichtet werden.

#### *3.1 Lokalisation der Mu-Insertion*

Über Mu d1 Insertion wurden in unserem Labor von Ch. Jatisatienr 23 Fusionen in anaeroben Genen isoliert (Pecher et al., 1983). Die lac-Fusionsstämmen wurden stabilisiert durch Isolierung hitzeresistenter Derivate, die eine deutlich erniedrigte Transpositionshäufigkeit des Mu-Prophagen aufweisen (Zinoni, Diplomarbeit, 1983).

Sie ließen sich in fünf Gruppen einteilen; die getesteten Eigenschaften dieser Fusionsstämme sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Vertreter aus Gruppe 1 verhielten sich in allen durchgeführten Tests wie der Wildtyp. Die Mu-Insertion muß hier in einem Gen liegen, dessen Produkt nicht am anaeroben Kohlenhydratabbau beteiligt ist.

Die Fusionsstämme aus Gruppe 2 fielen durch fehlende Gasbildung und fehlende BV-Reduktion auf. Ein Defekt im Formiat-Hydrogenlyase-Komplex könnte zu diesem Phänotyp führen.

Gruppe 3 unterschied sich lediglich in der fehlenden Gasproduktion vom Wildtyp. Eine Mutation im Hydrogenasegen könnte dafür verantwortlich sein.

Ein Gen, das spezifisch die Übertragung von Elektronen auf Chlorat katalysiert, war in Gruppe 4 durch Mu-Insertion ausgefallen.

Die vielfältigen Defekte, zu beobachten bei Vertretern der Gruppe 5, wie fehlende Gasbildung und BV-Reduktion, Chloratresistenz und fehlendes anaerobes Wachstum auf Nitrat, lassen sich durch einen Ausfall des Molybdän-Cofaktors oder seines Einbaus in die entsprechenden Enzymsysteme erklären. An allen hier negativ ausgefallenen physiologischen Tests ist mindestens ein molybdänhaltiges Enzym beteiligt.

Vertreter aus den Gruppen Nr. 1, 2 und 3 wurden zu weiteren Analysen herangezogen.

Ihr beschriebener Phänotyp deutet darauf hin, daß bei Gruppe 1 eine Fusion in einem nicht durch diese Tests erfaßten anaeroben Gen, bei Gruppe 2 eine Fusion in einem Formiat-Dehydrogenase H Gen (fdhH::lac Fusion) und bei Gruppe 3 eine Fusion in einem Hydrogenasegen (hyd::lac Fusion) vorliegt.

Diese Annahmen konnten durch Bestimmung der Aktivität der entsprechenden Enzyme bestätigt werden.

Tabelle 4: Physiologische Eigenschaften der isolierten lac-Fusionsstämme

| Gruppe | Aerobes <sup>a</sup><br>Wachstum | Gas <sup>b</sup> | Chlorat- <sup>c</sup><br>Phänotyp | FDH <sup>d</sup><br>H | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -<br>Reduktase <sup>e</sup> | Anaerobes Wachstum |         | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +Fumarat |
|--------|----------------------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------|--------------------|---------|----------------------------------------|
|        |                                  |                  |                                   |                       |                                                          | Glucose            | Pyruvat | Glycerin                               |
| 1      | +                                | +                | S                                 | +                     | +                                                        | +                  | +       | +                                      |
| 2      | +                                | -                | S                                 | -                     | +                                                        | +                  | +       | +                                      |
| 3      | +                                | -                | S                                 | +                     | +                                                        | +                  | +       | +                                      |
| 4      | +                                | +                | R                                 | +                     | +                                                        | +                  | +       | +                                      |
| 5      | +                                | -                | R                                 | -                     | -                                                        | +                  | +       | -                                      |

<sup>a</sup> +: Bedeutet gleiches Wachstum wie der WT auf Glucose, Pyruvat oder Acetat als Q-Quellen

<sup>b</sup> +: Gasproduktion von Glucose oder Formiat

<sup>c</sup> S/R: Chlorat sensitiv oder resistent

<sup>d</sup> Plattentest für BV-abhängige Formiat-Dehydrogenase

<sup>e</sup> Plattentest für Nitrat-Reduktion

### 3.1.1 Hydrogenasetest

Vertreter aus Gruppe 3 waren in der Lage, Elektronen von Formiat über die intakte  $FDH_H$  auf den Redoxfarbstoff BV zu übertragen, jedoch nicht mehr auf Protonen aus dem Medium. Die Hydrogenase, die den letzten Schritt dieser Reaktionssequenz katalysiert, der schließlich zur Wasserstofffreisetzung führt, schien durch Mu-Insertion ausgefallen zu sein. Durch Bestimmung der Hydrogenaseaktivität konnte diese Annahme bestätigt werden (Tab. 5).

Tabelle 5: Hydrogenaseaktivität bei anaerober Anzucht im *E. coli* Stamm MC4100 und den isolierten lac-Fusionsstämmen

| Stamm                             | Hydrogenaseaktivität |
|-----------------------------------|----------------------|
| M3s ( <u>hyd</u> :: <u>lac</u> )  | 0.08                 |
| M9s ( <u>fdhH</u> :: <u>lac</u> ) | 0.98                 |
| M16s (nicht definiert)            | 1.03                 |
| M17s ( <u>hyd</u> :: <u>lac</u> ) | 0.095                |
| MC4100 (Wildtyp)                  | 0.97                 |

Die angegebenen Werte entsprechen  $\mu\text{Mol H}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ .

Wie die dargestellten Werte zeigen, war in den Mutanten M3s und M17s, den beiden Vertretern aus Gruppe 3, nur mehr ein Zehntel der Wildtyp-Hydrogenaseaktivität nachweisbar. Die beiden anderen Fusionsstämmen hatten normale Hydrogenaseaktivität. Den endgültigen Beweis, daß Mu d1 in diesen Mutanten in das hyd-Gen (Strukturgen der Hydrogenase) inseriert hatte, wurde durch Transduktionsexperimente erbracht (Zinoni, Diplomarbeit, 1983).

### 3.1.2 Benzylviologen-Reduktion

Die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse legen nahe, daß in einer der Mutanten eine  $\mu$ d1-Integration in ein Strukturgen der  $FDH_H$  vorliegt. Die beiden Formiat-Dehydrogenasen in *E. coli*, die an verschiedenen Wegen des Katabolismus beteiligt sind, unterscheiden sich neben anderen Merkmalen auch in ihrer Fähigkeit, verschiedene Redoxfarbstoffe als Elektronen-akzeptoren benutzen zu können (siehe auch Einleitung!). Die  $FDH_H$  reduziert BV, jedoch nicht die Redoxfarbstoffe Methylblau, Phenazinmethosulfat (PMS) und Dichlorphenolindophenol (DCPIP).

Die  $FDH_N$  zeigt das umgekehrte Verhalten.

Durch Zugabe von Nitrat ins Medium wird die Synthese der  $FDH_N$  induziert, die der  $FDH_H$  dagegen reprimiert, was ihrer physiologischen Rolle Rechnung trägt.

Die isolierten Fusionsmutanten zeigten in den durchgeführten Formiat-Dehydrogenase-Enzymtests folgendes Verhalten (Tab. 6).

Tabelle 6: Aktivität der  $FDH_H$  und der  $FDH_N$  im *E. coli* Stamm MC4100 und in den isolierten lac-Fusionsstämmen

| Stamm  |                      | <u>BV-Reduktion</u>           | <u>PMS-DCPIP-Reduktion</u>    |                               |                               |
|--------|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|        |                      | Wachstum                      |                               |                               |                               |
|        |                      | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | -NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | -NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| M3s    | ( <u>hyd::lac</u> )  | 0.18                          | 2.50                          | 6.5                           | 0.32                          |
| M9s    | ( <u>fdhH::lac</u> ) | 0.23                          | 0                             | 4.04                          | 0.37                          |
| M17s   | ( <u>hyd::lac</u> )  | 0.15                          | 2.13                          | 6.8                           | 0.54                          |
| MC4100 | (Wildtyp)            | 0.15                          | 2.8                           | 7.1                           | 0.23                          |

Die Aktivitäten sind in  $\mu\text{Mol Formiat} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$  angegeben.

Zellen, die bei Anwesenheit von Nitrat im Wachstumsmedium (Nitratatmung) gezogen wurden, zeigten in ihren Extrakten eine hohe Reduktionsaktivität für Phenazinmethosulfat und Dichlorphenolindophenol. Fehlte jedoch der Induktor Nitrat, sanken die Werte auf etwa 10 %. Ohne externen Elektronenakzeptor war die BV-Reduktion hoch. Nur Mutante M9s führte auch unter diesen Bedingungen keine BV-Reduktion durch. In allen Fällen war bei Anwesenheit von Nitrat im Anzuchtmedium nur mehr geringe BV-Reduktion meßbar.

### *3.2 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Fusionsstämmen*

$\beta$ -Galaktosidaseaktivität kann durch einen einfachen Enzymtest rasch und unter aeroben Bedingungen bestimmt werden (Miller, 1972).

Die Regulation der Transkription des hyd- und des fdhH-Gens, in denen eine Mu-Insertion stattgefunden hatte, konnte somit auf elegante Weise studiert werden. Auch das Regulationsverhalten der nicht definierten Fusion in M16s wurde analysiert. Dazu wurden die Stämme in WM-Medium unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit Glucose und Glycerin als C-Quellen angezogen. Zuerst wurde der Einfluß von Nitrat und Fumarat, die im anaeroben Stoffwechsel als Elektronenakzeptoren fungieren, auf die Transkription dieser "anaeroben" Gene bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

In Tabelle 8 ist dann die Wirkung von Formiat auf die  $\beta$ -Galaktosidasesynthese in diesen Stämmen aufgezeigt.

Aus den Ergebnissen können folgende Schlüsse gezogen werden:

- die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase ist voll reprimiert in Gegenwart von Sauerstoff und Nitrat;
- Elektronentransport zu Fumarat führt dagegen nur zu partieller Repression;

Tabelle 7:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den lac-Fusionsstämmen und im Wildtyp KL19 bei Wachstum auf Glucose und Glycerin mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren

| Stamm                    | Aerob     |  | Anaerob                            |  |                                    |  |
|--------------------------|-----------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
|                          | O.8 % Glc |  | O.8 % Glc                          |  | O.8 % Gly                          |  |
|                          |           |  | 50 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |  | 50 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |  |
| M3s ( <u>hyd::lac</u> )  | 0         |  | 90                                 |  | 0                                  |  |
| M9s ( <u>fdhH::lac</u> ) | 0         |  | 52                                 |  | 0                                  |  |
| M17s ( <u>hyd::lac</u> ) | 0         |  | 130                                |  | 0                                  |  |
| M16s (nicht definiert)   | 0         |  | 65                                 |  | 0                                  |  |
| KL19 WT                  | 2 500     |  | 4 075                              |  | 2 950                              |  |
|                          |           |  | 3 100                              |  | 3 000                              |  |

Daten in  $\beta$ -Galaktosidaseeinheiten nach Miller (1972)

Tabelle 8: Einfluß von Formiat auf die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den lac-Fusionsstämmen

| Stamm                    | Aerob      |  | Anaerob                            |  |                                    |  |
|--------------------------|------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
|                          | O.4 % Glc  |  | O.8 % Glc                          |  | O.87 % Gly                         |  |
|                          | 15 mM Form |  | 10 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |  | 50 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |  |
| M3s ( <u>hyd::lac</u> )  | 0          |  | 175                                |  | 98                                 |  |
| M9s ( <u>fdhH::lac</u> ) | 0          |  | 120                                |  | 49                                 |  |
| M17s ( <u>hyd::lac</u> ) | 1          |  | 205                                |  | 119                                |  |
| M16s (nicht definiert)   | 0          |  | 160                                |  | 73                                 |  |
| KL19 WT                  |            |  | 1 800                              |  | 3 100                              |  |
|                          |            |  | 2 011                              |  | 2 950                              |  |

Die angegebenen Werte entsprechen den  $\beta$ -Galaktosidaseeinheiten wie sie von Miller (1972) definiert wurden.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

Glc = Glucose; Gly = Glycerin; Form = Formiat; WT = Wildtyp

- unter anaeroben Bedingungen wird durch Formiatzugabe die  $\beta$ -Galaktosidasesynthese stimuliert;
- hohe Konzentrationen an Formiat revertieren dabei die Nitrat-repression;
- die Sauerstoffrepression der getesteten anaeroben Fusionsstämme wird dagegen durch Formiat nicht revertiert;
- generell sind die Werte der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Fusionsstämmen im Vergleich zum Kontrollstamm KL19, der ein Wildtyp-Laktoseoperon auf dem Chromosom trägt, sehr niedrig. Dies erklärt auch die Tatsache, daß alle isolierten Fusionsstämme nicht auf Laktose als einziger C-Quelle wachsen können. Eine Erklärung für diese niedrige Aktivität wird später diskutiert.

### *3.2.1 Einfluß anderer Säuren auf die $\beta$ -Galaktosidasesynthese*

Um sicherzustellen, daß die stimulierende Wirkung von Formiat auf die  $\beta$ -Galaktosidasesynthese in den Fusionsstämmen ein spezifischer Effekt ist, wurde auch die Wirkung anderer saurer Stoffwechselprodukte getestet. Als Teststamm wurde die hyd::lac Fusion M17s verwendet. Die Säuren wurden als Na-Salze zugegeben, der pH des Mediums in allen Fällen auf den Wert des Kontrollmediums eingestellt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

siehe Tabelle 9 →

Tabelle 9: Einfluß von Säuren auf die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Stamm M17s (hyd::lac)

| Anzuchtbedingungen           | Elektronenakzeptor |                  |
|------------------------------|--------------------|------------------|
|                              | $-\text{NO}_3^-$   | $+\text{NO}_3^-$ |
| 0.8 % Glucose                | 136                | 0                |
| 0.8 % Glucose + 20 mM Lactat | 156                | 0                |
| + 20 mM Acetat               | 230                | 0                |
| + 20 mM Formiat              | 432                | 80               |
| + 20 mM Succinat             | 125                | 0                |

Werte in  $\beta$ -Galaktosidaseeinheiten nach Miller (1972) angegeben. Wachstum erfolgte anaerob auf WM-Medium mit 10  $\mu\text{M}$  Molybdat und Selenit und 1 ml/l einer Spurenelementlösung (siehe Material und Methoden)

Die Daten zeigen, daß neben der starken induzierenden Wirkung von Formiat auf die  $\beta$ -Galaktosidasesynthese nur Acetat einen leichten Effekt ausübt. Nur Formiat kann jedoch die Repression der  $\beta$ -Galaktosidasesynthese durch Nitrat zum Teil (bei hoher Konzentration ganz) wieder aufheben. Andere organische Säuren zeigen keinen solchen Effekt.

### 3.2.2 Einfluß der pfl-Mutation auf die $\beta$ -Galaktosidasesynthese in den Fusionsstämmen

Die vorliegenden Untersuchungen legen den Schluß nahe, daß Formiat eine entscheidende Rolle als Induktor bei der Expression "anaerober" Gene spielt.

Da nun in einem Stamm mit einer Mutation im pfl-Gen dieser interne Induktor nicht mehr synthetisiert werden kann, sollte die Expression des lacZ-Gens in den Fusionsstämmen in einem pfl-genetischen Hintergrund ausbleiben.

Um dies zu überprüfen, wurden die Fusionen mittels P1 Transduktion über Selektion auf Ampicillin-Resistenz in die pfl-Mutante CB898 transduziert. CB898 trägt außerdem eine Mutation in lacZ-Gen (Varenne et al., 1975).

Die Anzucht der Stämme erfolgte anaerob in WM-Medien mit 0.8 % Glucose und 1 % Acetat als C-Quellen. PFL-Mutanten führen nämlich unter Anaerobiose eine reine homofermentative Milchsäuregärung durch und benötigen deshalb zur Auffüllung der Metabolite des Zitronensäurezyklus für Biosynthesen einen C<sub>2</sub>-Kohlenstoffkörper (Pascal et al., 1981).

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Alle getesteten Fusionsstämme zeigen im pfl-Hintergrund stark verringerte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität.

Tabelle 10:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im pfl-genetischen Hintergrund

| Stamm                                         | Genotyp                 |                         |
|-----------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                               | <u>pfl</u> <sup>-</sup> | <u>pfl</u> <sup>+</sup> |
| M9s ( <u>fdhH::lac</u> )                      | 7                       | 70                      |
| M17s ( <u>hyd::lac</u> )                      | 0                       | 190                     |
| CB898 ( <u>pfl</u> <sup>-</sup> -Elternstamm) | 0                       | nicht bestimmt          |

Werte entsprechen  $\beta$ -Galaktosidaseeinheiten nach Miller (1972)

### 3.2.3 Einfluß der fnr-Mutation auf die $\beta$ -Galaktosidasesynthese in den Fusionsstämmen

Das fnr-Genprodukt ist als Aktivator für die Transkription anaerober Gene essentiell (Shaw and Guest, 1981; Chippaux et al., 1981). Interessant war nun zu überprüfen, ob auch die Transkription unserer lac-Fusionsstämme vom fnr-Gen beeinflusst wird.

Dazu wurden in analoger Weise - wie vorher beschrieben - die Fusionen über P1-Transduktion in die fnr-Mutante FM56 transduziert. FM56 ist ein Derivat von JRG861a, dem ursprünglichen fnr-Stamm von J. Guest, mit einer Deletion im lac-Operon auf dem Chromosom (Stammkonstruktion von Franz Zinoni). Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich aus Tabelle 11 entnehmen.

Tabelle 11:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im fnr-genetischen Hintergrund

| Stamm                             | Genotyp                 |                         |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                   | <u>fnr</u> <sup>+</sup> | <u>fnr</u> <sup>-</sup> |
| M3s ( <u>hyd</u> :: <u>lac</u> )  | 157                     | 58                      |
| M9s ( <u>fdhH</u> :: <u>lac</u> ) | 53                      | 7.5                     |
| M16s (nicht definiert)            | 134                     | 82                      |
| M17s ( <u>hyd</u> :: <u>lac</u> ) | 144                     | 51                      |

Anzucht der Stämme erfolgte anaerob auf WM-Medium mit 0.05 % Casaminosäuren, 5 µg/ml Uracil, 50 µg/ml Tryptophan und 25 µg/ml Ampicillin. Werte in  $\beta$ -Galaktosidaseeinheiten nach Miller (1972) angegeben.

Ein Effekt der fnr-Mutation ist in allen Fusionsmutanten zu beobachten, wenn auch von unterschiedlichem Ausmaß. Stark gehemmt ist die  $\beta$ -Galaktosidasesynthese im fdh::lac Fusionsstamm M9s, während sie in den hyd::lac Fusionen nur auf etwa die Hälfte zurückgeht. Auch in der nicht definierten Fusion M16s ist der Einfluß der fnr-Mutation relativ gering.

#### 4. Untersuchungen zur Struktur und Regulation der Selenopeptide der $\text{FDH}_\text{H}$ und $\text{FDH}_\text{N}$

##### *4.1 Markierung der Selenopeptide mit $^{75}\text{Se}$ -Selenit*

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde analysiert, in welches der Strukturgene der  $\text{FDH}_\text{H}$  Mu  $\underline{\text{d1}}$  in der Mutante M9s inseriert hatte. Diese Untersuchungen wurden durch das Fehlen detaillierter Informationen über Untereinheitenstruktur und genetische Lokalisation der Strukturgene erschwert. Eine Analogie zum Aufbau der  $\text{FDH}_\text{N}$  scheint jedoch plausibel. Die  $\text{FDH}_\text{N}$  aus *E. coli* ist aus drei Polypeptiden aufgebaut (Enoch und Lester, 1975), für die folgende Molekulargewichte bestimmt wurden: 110 Kd, 32 Kd und 20 Kd. Wegen der extremen Sauerstofflabilität des Enzyms wurde eine Reinigung der  $\text{FDH}_\text{H}$ , die wesentlich oxidationsempfindlicher ist, bis jetzt nicht durchgeführt. Ein gemeinsames Merkmal beider Formiat-Dehydrogenasen ist jedoch ihr Bedarf an Metallionen. So benötigen beide für ihre Aktivität Eisen, Molybdän und Selen.

Das Selenopeptid der beiden Dehydrogenasen wurde erstmals von Cox und Mitarbeiter (1981) elektrophoretisch nachgewiesen. Sie konnten zeigen, daß die  $\text{FDH}_\text{N}$  ein Selenopolypeptid mit einem Molekulargewicht von 110 Kd besitzt; das Selenopolypeptid der  $\text{FDH}_\text{H}$  ist mit 80 Kd kleiner. Da das Selenopolypeptid die Strukturkomponente mit dem höchsten Molekulargewicht ist, lag nahe, zunächst zu testen, ob die Mu-Insertion der  $\text{FDH}_\text{H}$  Mutante M9s in diesem Gen stattgefunden hatte.

Um die zwei verschiedenen Formiat-Dehydrogenasen optimal zu induzieren, wurden die Kulturen anaerob mit und ohne Nitrat angezogen. Der mit  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markierte Zellextrakt wurde auf einem 7%igen bis 15%igen SDS-Gradientengel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurden nicht radioaktiv markierte Eichproteine verwendet.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis.

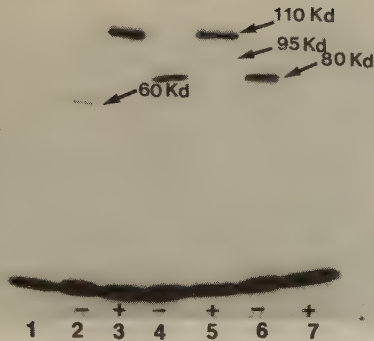


Abbildung 13:

Auftrennung der  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markierten Extrakte der beiden lac-Fusionsstämme, fdhH::lac M9s (Spur 2, 3), hyd::lac M17s (Spur 6, 7) und des Elternstammes MC4100 (Spur 4, 5) nach anaerober Anzucht mit und ohne Nitrat als Elektronenakzeptor (gekennzeichnet durch + und -). Spur 1 zeigt die fdhH::lac Fusion M9s nach aerober Anzucht.

Aus der Abbildung geht hervor, daß bei anaerober Anzucht mit Nitrat als Elektronenakzeptor in den zwei Fusionsstämmen M9s und M17s sowie im Elternstamm MC4100 die Synthese eines 110 Kd großen Selenopolypeptids induziert wird. Bei der 95 Kd großen, schwächeren Bande (Spur 3, 5) handelt es sich wahrscheinlich um ein proteolytisches Abbauprodukt, da ihr Auftreten durch Zugabe von PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), einem Serinproteasehemmer, fast vollständig unterdrückt werden kann. Unter Fermentationsbedingungen wurde in Stämmen mit der hyd::lac Fusion und im Wildtyp das 80 Kd große Selenopeptid der  $\text{FDH}_\text{H}$  gebildet. Das Selenopeptid der  $\text{FDH}_\text{N}$  war nur noch als schwache Bande erkennbar. Interessant war nun, daß Extrakte der Mutante M9s (Spur 2) anstelle des 80 Kd Selenopeptids eines von 60 Kd aufweisen. Bei Anwesenheit von Sauerstoff

(Spur 1) wurde die Synthese des verkürzten Peptids vollständig unterdrückt und nur das Selenopolypeptid der  $FDH_N$  war noch schwach markiert.

#### *4.2 Regulation der Synthese des verkürzten Selenopeptids*

Eine plausible Erklärung für das Auftreten dieses verkürzten Peptids in Mutante M9s ist, daß durch die Insertion des Phagen  $\mu_{d1}$  in das Strukturgen des Selenopolypeptids der  $FDH_H$  die Transkription und Translation zu einem vorzeitigen Abbruch kommen. Sollte dies der Fall sein, so müßte die Synthese des verkürzten Selenopolypeptids dem gleichen Regulationsregime unterliegen wie die des 80 Kd Selenoproteins.

Um dies zu untersuchen, wurde M9s unter verschiedenen Wachstumsbedingungen mit  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markiert. Der Extrakt wurde elektrophoretisch auf einem 7- bis 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt und autoradiographiert. Das erhaltene Ergebnis ist in Abbildung 14 aufgezeigt.

In der Fusionsmutante M9s wird genau wie im Wildtyp unter Anaerobiose mit Nitrat als Elektronenakzeptor (Spur 1) ein 110 Kd Selenopeptid induziert. Das in dieser Mutante verkürzte Selenoprotein der  $FDH_H$  wird unter diesen Anzuchtbedingungen nicht synthetisiert. Durch Zugabe von äquimolaren Mengen an Formiat (20 mM) kann jedoch auch bei Anwesenheit von Nitrat eine Synthese des Rumpfpeptids beobachtet werden (Spur 2). Dieses Ergebnis steht im guten Einklang mit den gemessenen  $\beta$ -Galaktosidasewerten in diesem Stamm, die zeigen, daß die Nitratrepression durch Formiat aufgehoben werden kann. Abweichend zu den Aktivitätsmessungen, kann jedoch keine vermehrte Synthese des 60 Kd Proteins unter Anaerobiose durch Zugabe von Formiat erreicht werden (Spur 3).

In Spur 4 ist die Synthese des Rumpfpeptids unter Anaerobiose ohne Formiat aufgezeigt.

Bei aerober Anzucht (Spur 1) wird das verkürzte Selenopeptid nicht mehr synthetisiert.

Interessant ist, daß eine Synthese des Selenopeptids

der  $FDH_N$  unter allen getesteten Anzuchtbedingungen zu beobachten war.

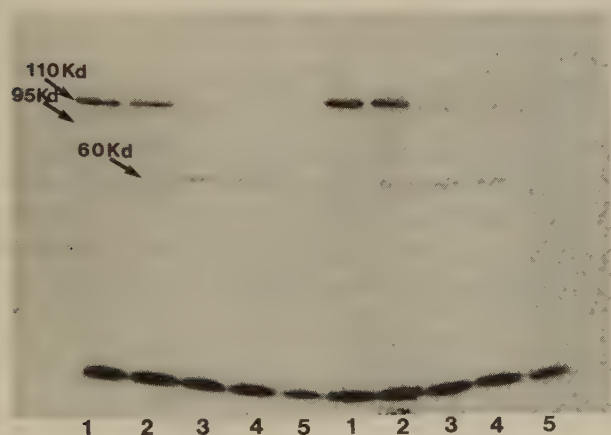


Abbildung 14:

Eindimensionale Auftrennung eines  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markierten Extraktes der Mutante M9s (*fdh::lac*) in einem 7- bis 15%igen SDS-Gradientengel. Wachstumsbedingungen waren:

- Spur 1: anaerob auf Glucose und Nitrat
- Spur 2: anaerob auf Glucose, Nitrat und Formiat
- Spur 3: anaerob auf Glucose und Formiat
- Spur 4: anaerob auf Glucose
- Spur 5: aerob auf Glucose

#### 4.3 Untersuchungen zur Identität des verkürzten Peptids mit dem Selenopeptid der $FDH_H$ des Wildtyps

Um nachzuweisen, daß das verkürzte Selenopeptid der Mutante M9s wirklich aus dem 80 Kd Peptid des Wildtyps hervorgegangen ist, sollte untersucht werden, ob durch Bromcyanspaltung aus beiden Peptiden gleich große  $^{75}\text{Se}$ -haltige Fragmente abgespalten werden können. Damit wäre zumindest der Beweis erbracht, daß beide Polypeptide in identischen Spaltprodukten Selen enthalten.

Dazu wurden die Mutante M9s und ihr Elternstamm MC4100 - wie bereits beschrieben - mit  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markiert. Der Zellrohextrakt beider Kulturen wurde nach der Methode von Gross und Witkop (1962) mit Bromcyan behandelt und anschließend auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamid aufgetrennt.

Wie man dem Autoradiogramm eines solchen Gels entnehmen kann (Abb. 15), traten in beiden Stämmen nach Bromcyanspaltung zwei identische  $^{75}\text{Se}$  markierte Peptide (Pfeile, Spur 1 und 2) auf. Die ursprünglichen Selenoproteine von 60 Kd beziehungsweise 80 Kd waren noch als schwache Bande erkennbar, was auf unvollständige Spaltung hinweist. Als Kontrolle wurden die nicht mit Bromcyan behandelten Extrakte mitaufgetragen (Spur 3 und 4).

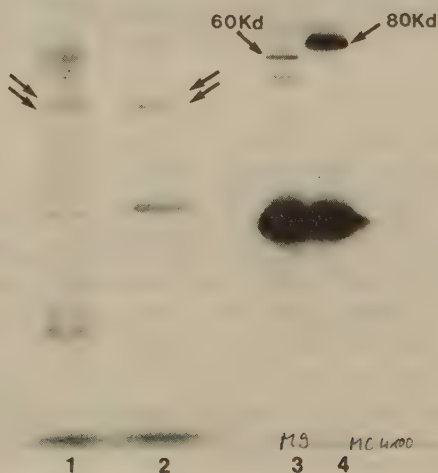


Abbildung 15:

Auftrennung der mit  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markierten Extrakte des Wildtyps MC4100 (Spur 2) und der Mutante M9s (Spur 1) auf einem 15%igen Polyacrylamidgel nach Spaltung mit Bromcyan. In Spur 3 (M9s) und Spur 4 (MC4100) wurden die nicht behandelten Extrakte aufgetragen. Die intensiv markierten Banden in den nicht mit Bromcyan behandelten Extrakten enthalten selenierte tRNA. Die anaerobe Anzucht erfolgte auf LB-Medium mit 0.2 % Glucose.

#### 4.4 Identifizierung der Selenopeptide der $FDH_N$ und $FDH_H$ auf O'Farrell-Gelen

Wie aus der eindimensionalen Auftrennung der  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markierten Extrakte entnommen werden kann, werden demnach in *E. coli* wahrscheinlich nur zwei selenhaltige Proteine, nämlich  $FDH_H$  und  $FDH_N$  synthetisiert. Neben den beiden Formiat-Dehydrogenasen scheinen nur noch selenhaltige tRNA-Spezies vorzukommen (Chen und Stadtman, 1980; Ching und Stadtman, 1982; Wittmann, 1983). Diese Tatsache sollte eine Identifizierung der Selenopeptide der beiden Formiat-Dehydrogenasen auf zweidimensionalen Gelen erleichtern.

Um eine solche Lokalisation vorzunehmen, wurden Kulturen von MC4100 anaerob in LB-Medium mit und ohne Nitrat als Elektronenakzeptor angezogen und mit  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markiert. Der Zell-extrakt wurde nach O'Farrell aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Die coomassiegefärbten Gele und die zugehörigen Autoradiogramme von MC4100 sind in Abbildung 16 A und B dargestellt.

Proteine, die radioaktives Selen enthalten, wurden auf dem gefärbten Gel in eckige Klammern gesetzt.

Bei anaerober Anzucht in Gegenwart von Nitrat (Abb. 16 A) wurden zwei selenhaltige Polypeptide identifiziert. Sie liegen im Molekulargewichtsbereich des Selenopeptids der  $FDH_N$ . Das 95 Kd Peptid, auch auf eindimensionalen Gelen sichtbar, wurde schon vorher als mögliches Abbauprodukt des 110 Kd Peptids diskutiert.

Das 110 Kd große Peptid ist auf der äußerst linken Gelseite lokalisiert. Es ist also ein sehr basisches Protein. Auffällig ist außerdem, daß in der ersten Dimension keine scharfe Auftrennung erfolgt, sondern eine "verschmierte" Bande resultiert, ein, für membrangebundene Proteine, typisches Verhalten auf O'Farrell-Gelen.

Unter Wachstumsbedingungen, unter denen die Synthese der  $FDH_H$  induziert wird (Abb. 16 B), konnte ein Selenopeptid von zirka

80 Kd links neben der Position der PFL identifiziert werden.

Im Stamm FM911(pFM3), der das klonierte Strukturgen des Selenopeptids fdhH auf dem Vektor pACYC184 enthält (Zinoni, unveröffentlicht), aber die fdhH-Region auf dem Chromosom deletiert hat, wird unter denselben Bedingungen an der gleichen Stelle ein radioaktives Peptid sichtbar (Abb. 16 C).

Abbildung 16 A: MC4100 anaerob auf Glucose und Nitrat



Abbildung 16 A, B, C:

O'Farrell Auftrennung eines  $^{75}\text{Se}$ -Selenit markierten Extraktes von MC4100 (Abb. 16 A,B) und FM911 (pFM3) (Abb. 16 C). Die Stämme wurden dazu anaerob in folgenden Medien angezogen:

- (A): LB-Medium mit Glucose und Nitrat
- (B): LB-Medium mit Glucose
- (C): LB-Medium mit Glucose

Das Autoradiogramm des coomassiegefärbten Gels ist jeweils rechts unten in verkleinerter Form dargestellt. Das entsprechende selenmarkierte Polypeptid auf dem gefärbten Gel wurde in eckige Klammern gesetzt.

Abbildung 16 B MC4100 anaerob auf Glucose



Abbildung 16 C FM911(pFM3) anaerob auf Glucose



## D. DISKUSSION

---

Ziel dieser Arbeit war es, Einblick in die Mechanismen zu gewinnen, über die fakultative Anaerobier die Synthese von Gärungsenzymen steuern.

Als Arbeitsmodell wurde die Reaktionssequenz der Pyruvat-Formiat-Lyase, Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase in *E. coli* gewählt. Es ist dazu gut geeignet, da seine Reaktionsfolge zu keinem Energiegewinn führt. Mutationen in den entsprechenden Genen haben deshalb keinen Einfluß auf den Energiezustand der Zelle, und Regulationsuntersuchungen können so unter normalen physiologischen Bedingungen durchgeführt werden.

### 1. Untersuchungen an der Pyruvat-Formiat-Lyase

#### *1.1 Regulatorische Eigenschaften*

Sowohl die Synthese als auch die Aktivität der PFL werden von Sauerstoff beeinflusst.

Der Aktivierungsprozeß, von Knappe und Mitarbeiter detailliert erarbeitet (siehe Einleitung, S.6-7), macht eine schnelle Anpassung des Stoffwechsels beim Übergang zur Anaerobiose möglich: In aerob gezogenen Zellen liegt die PFL etwa zu 10 % ihres maximalen Spiegels vor, jedoch in der inaktiven Form. Aus den geschilderten Markierungsversuchen geht hervor, daß unter anaeroben Anzuchtbedingungen eine Steigerung der Enzymsynthese um etwa das Vierfache stattfindet. Wie die O'Farrell Elektropherogramme zeigen, wird PFL auch bei Anwesenheit von externen Elektronenakzeptoren wie Nitrat oder Fumarat unter anaeroben Bedingungen in deutlich höherem Maße als bei aerober Anzucht synthetisiert.

Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Cole und Mitarbeitern (Wimpenny und Cole, 1967; Cole und Wimpenny, 1968) überein, die Formiat als den physiologischen Elektronendonator bei der Nitrat-Reduktion erkannten. Formiat entsteht jedoch nur in der durch PFL katalysierten Spaltung von Pyruvat.

Tabelle 12: Spezifische Aktivität der PFL in *E. coli* ATCC10798 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

| Wachstumsbedingungen           | Spezifische Aktivität<br>U/mg Protein |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| <i>anaerob:</i>                |                                       |
| 50 mM Glucose                  | 5 - 6                                 |
| 50 mM Glycerin + 50 mM Fumarat | 4                                     |
| <i>aerob:</i>                  |                                       |
| 50 mM Glucose                  | 0.5 - 1.0                             |
| 15 mM Acetat                   | 0.7                                   |

Die Werte entsprechen der Summe der Aktivität, gemessen in der aktiven und inaktiven Form des Enzyms pro mg Protein im 100 000 g Überstand.

Gestützt werden diese Daten auch durch die von Knappe und Mitarbeitern gemessenen Enzymaktivitäten (siehe Tab. 12). Bei anaerobem Wachstum auf Glycerin und Fumarat werden von ihnen fast gleiche Aktivitäten festgestellt wie unter Anaerobiose in Abwesenheit eines externen Elektronenakzeptors. Die unter anaeroben Bedingungen um die fünf- bis zehnfach gesteigerte Enzymaktivität steht in Einklang mit unseren Bestimmungen der Enzymsynthese.

### 1.2 Klonierung des Strukturgens der Pyruvat-Formiat-Lyase

Durch verschiedene Methoden konnte eindeutig gezeigt werden, daß das Strukturgen der PFL, zusammen mit seiner Kontrollregion, auf dem Plasmid p29 kloniert vorliegt:

- Die Restriktionskarte von Plasmid p29 ist identisch mit der entsprechenden Region auf dem ursprünglich isolierten transduzierenden Phagen  $\lambda$ aspC2.
- Im limitierten Abbau mit *Staphylococcus aureus* V8 Protease erhält man mit plasmid-kodiertem Enzym ein gleiches Peptidmuster wie mit chromosomal-kodiertem Enzym, das unter Anaerobiose induziert wird.
- Beide Enzyme unterliegen einer identischen Regulation durch Sauerstoff. So ist die Menge der synthetisierten PFL sowohl bei aerober als auch bei anaerober Anzucht mit Glucose als C-Quelle im plasmidhaltigen Stamm um das Zehnfache gegenüber dem Vergleichsstamm, der nur chromosomal-kodiertes Enzym exprimiert, erhöht.

Dieser Wert entspricht etwa der Erhöhung der Kopienzahl des pfl-Gens durch Klonierung auf dem Multikopievektorplasmid pACYC184 (Chang und Cohen, 1978). Eine Autoregulation der PFL Synthese, wie sie für ribosomale Proteine gefunden wurde (Geyl und Böck, 1977), kann somit ausgeschlossen werden. Bei aerober Anzucht auf Lactat dagegen verdoppelt sich dieser Wert, was auf Austitration eines Repressormoleküls, das normalerweise die aerobe Expression verhindert, hinweisen könnte.

### 1.3 Strukturelle Eigenschaften

Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen besteht die PFL aus zwei identischen Untereinheiten.

Die früher diskutierte  $\beta$ -Untereinheit entsteht durch Proteolyse aus der  $\alpha$ -Untereinheit. Eine, über geänderte Methodik, von Knappe gereinigte Enzymfraktion enthält fast ausschließlich  $\alpha$ -Untereinheit (95 %) und bestätigt damit die  $\alpha_2$ -Struktur (Knappe, persönliche Mitteilung). Es ist anzunehmen, daß eine Domäne des Enzyms einem proteolytischen Abbau besonders leicht zugänglich ist; Spaltung in diesem Bereich führt zur vermeintlichen  $\beta$ -Untereinheit.

## 2. Regulationsverhalten anderer Proteine

Charakteristische Unterschiede zwischen Aerobiose und Anaerobiose im Stoffwechselweg, der Energiegewinnung und des Elektronenflusses waren bereits Gegenstand detaillierter Untersuchungen (Gray et al., 1966b; Krebs, 1972; Thomas et al., 1972). So fällt zum Beispiel der Anteil des Pentosephosphatzyklus am Glucoseabbau von 25 % auf 5 % bis 8 % unter anaeroben Bedingungen, während sich der Glucoseverbrauch gleichzeitig ungefähr verdreifacht. Dieser erhöhte Glucoseumsatz setzt natürlich eine höhere Effektivität der Enzyme des Embden-Meyerhof-Wegs unter Anaerobiose voraus. Das Zusammenwirken zweier Mechanismen, nämlich Steigerung der Aktivität der beteiligten Enzyme und erhöhte Syntheserate, macht diese Anpassungsleistung des Organismus möglich. Für die Glykolyseenzyme Phosphofruktokinase, Phosphoglucose-Isomerase, Aldolase und Pyruvatkinase wurden unter anaeroben Bedingungen höhere Enzymaktivitäten gemessen. Eine Steigerung der Synthese konnte nun auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen für die PFL, Enolase und die Phosphofruktokinase gezeigt werden. Ob unter den anderen, nicht identifizierten Polypeptiden, deren Synthese unter anaeroben Bedingungen induziert wird, sich noch weitere Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges befinden, bleibt offen, da deren Lokalisation auf zweidimensionalen Gelen noch weitgehend unbekannt ist.

Unter den aerob dereprimierten Proteinen befinden sich zwei Enzyme des Zitronensäurezyklus, die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase und die  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-Coenzym A-Synthetase. Die Rolle des Zitronensäurezyklus im Gärungsstoffwechsel ist auf seine biosynthetische Funktion beschränkt und damit von untergeordneter Bedeutung. Eine anaerobe Repression wurde bereits beschrieben für  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Citrat-Synthetase und Aconitase (Amarasingham und Davis, 1965; Hespell, 1976, Wimpenny und Cole, 1967). Die Synthese der meisten

Enzyme des Zitronensäurezyklus unterliegt zusätzlich der Katabolitrepresion. Dies zeigt, daß neben der gemeinsamen Regulation durch Sauerstoff auch noch andere Regulationssignale existieren, die ein koordiniertes Verhalten dieser Enzyme zur Folge haben.

Bei Anwesenheit von Nitrat als Elektronenakzeptor ist genau wie bei aerobem Wachstum die Synthese der "aeroben" Proteine induziert, während einige typische "anaerobe" Proteine nicht mehr synthetisiert werden. Nitrat wirkt also ähnlich wie Sauerstoff auf die Synthese anaerober Enzyme.

### 3. Untersuchungen mit Hilfe von lac-Fusionsstämmen

Durch Lysogenisierung mit Mu d1 (Ap<sup>R</sup>, lac) wurden Mutanten in *E. coli* erzeugt, die Defekte in anaerob exprimierten Genen aufweisen. Die Transkription der lac-spezifischen Gene, denen eine eigene Promotor-Operator-Region fehlt, erfolgt über die Startsignale dieser Gene. Bei der Translation der gebildeten Fusions-mRNA werden jedoch keine Fusionsproteine synthetisiert, da eine eigene Startsequenz (Shine und Dalgarno, 1974). für Ribosomen auf dem lacZ Abschnitt kodiert wird. Durch Verwendung solcher lac-Fusionen konnte deswegen gezeigt werden, daß die Regulation durch Sauerstoff auf der Ebene der Transkription stattfindet.

Zunächst mußte jedoch der Integrationsort des Phagen über die daraus resultierende Mutation bestimmt werden. Aus einer größeren Anzahl von Fusionsstämmen konnten dabei zwei Klassen biochemisch und genetisch eindeutig identifiziert werden.

#### 3.1 *hyd::lac* Fusion

Es wurden zwei Mutanten isoliert, in denen es durch Insertion des Phagen Mu zum Ausfall der Gasbildung kommt. Wie in Enzymtests gezeigt werden konnte, beruht dies auf einem Defekt eines für die Synthese aktiver Hydrogenase verantwortlichen Gens. In diesen Stämmen ist die BV-abhängige Formiat-Dehydrogenase (FDH<sub>H</sub>) weiterhin aktiv; die Hydrogenase besitzt jedoch

nur mehr 10 % der Aktivität des Wildtyps.

Gestützt werden diese Daten durch die Tatsache, daß die hyd::lac Fusion mit gleicher Frequenz wie das Hydrogenasestrukturgen (Graham et al., 1980b) mit cysC cotransduzierbar ist (Zinoni et al., 1984).

### 3.2 fdh::lac Fusion

In einem der erhaltenen Mutanten inaktiviert der inserierte Mu-Phage eines der Gene für die Formiat-Dehydrogenase ( $FDH_H$ ); dadurch kommt es ebenfalls zum Ausfall der Gasbildung. In den Enzymaktivitäts-Bestimmungen unterscheidet sich diese Fusion von der hyd::lac Fusion durch fehlende BV-Reduktion bei intakter Hydrogenaseaktivität. Durch P1 Transduktion wurde die fdh::lac Fusion bei Minute 94 auf dem Chromosom von E. coli kartiert (Zinoni, Diplomarbeit, 1983).

### 3.3 Regulation der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

Durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität konnte Einblick in das Regulationsverhalten der Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase gewonnen werden. Da die Galactosidpermease nicht vollständig durch Mu d1 kodiert wird, ist das fehlende Wachstum der Fusionsmutanten auf Lactose leicht verständlich.

In allen getesteten Fusionsstämmen ist die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase voll reprimiert in Gegenwart von Sauerstoff und Nitrat als Elektronenakzeptoren. Elektronentransport zu Fumarat führt dagegen nur zu einer teilweisen Repression.

Aus diesen Beobachtungen kann zweierlei geschlossen werden:

- Die aerobe Repression wird nicht von Sauerstoff selbst bewirkt, sondern beruht auf seiner Eigenschaft als Elektronenakzeptor.
- Das Ausmaß der Repression korreliert mit der Höhe des Redoxpotentials.

Die Redoxkontrolle der Synthese der Gärungsenzyme setzt damit auf der Ebene der Transkription ein. Die Höhe des Standardredoxpotentials nimmt in der Reihenfolge Sauerstoff ( $E^{\circ}/H_2O$ : 0.82 V), Nitrat ( $E^{\circ}NO_3^-/NO_2^-$ : 0.42 V), Fumarat ( $E^{\circ}Fumarat/Succinat$ : -0.031 V) ab. Der Redoxzustand der Zelle scheint die absolute Meßgröße zu sein, nach der die Regulation entsprechender Enzymsysteme veranlaßt wird. Ob dabei Komponenten der Elektronentransportkette als Sensoren in Betracht kommen, bedarf einer weiteren Überprüfung durch geeignete Mutanten, die Defekte in Elektronenüberträgermolekülen besitzen. Die Elektronentransportketten zu Sauerstoff oder Nitrat haben einige gemeinsame Komponenten wie zum Beispiel Chinone oder Häm enthaltende Carrier, die als Sensoren wirken könnten.

Gut in das Bild der Redoxkontrolle paßt auch die Beobachtung, daß die Repression von Nitrat durch Zugabe von Formiat aufgehoben werden kann, nicht jedoch die stärkere Repression durch Sauerstoff.

Formiat spielt als Induktor für die Expression anaerober Enzyme nach den erhaltenen Daten eine wichtige Rolle. Generell läßt sich eine Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den isolierten lac-Fusionen bei Anwesenheit von Formiat nachweisen. Wird eine pfl-Mutation über P1 Transduktion in die Fusionsstämme eingebracht, und damit die Synthese des internen Induktors unterbunden, so bleibt  $\beta$ -Galaktosidase-Synthese aus. Die Funktion als interner Induktor ist auf Formiat beschränkt, wie Versuche mit anderen sauren Stoffwechselprodukten zeigten.

### 3.4 Regulation durch das FNR-Protein

Das FNR-Protein, von Guest und Mitarbeitern genauer untersucht, ist als Aktivatorprotein für die Expression anaerob dereprimierter Gene bekannt. Auch die in unserem Labor isolierten Fusionsstämme zeigten im fnr-genetischen Hintergrund geringere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten. Die Synthese dieser Enzyme ist also ebenfalls abhängig von fnr. Ob die Aktivität oder Synthese des Regulatorproteins vom Redox-

zustand der Zelle direkt, oder über ein weiteres Effektor-molekül beeinflusst wird, bedarf noch der weiteren Klärung.

### 3.5 Eigenschaften redoxinsensitiver Mutanten

Interessante Aspekte zu den hier gefundenen Regulationsphänomenen lieferten redoxinsensitive Sekundärmutanten, die, ausgehend von der hyd::lac Fusion, von Franz Zinoni isoliert wurden (Zinoni et al., 1984). Sie sind durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

- Die anaerobe Repression der  $\beta$ -Galaktosidasesynthese durch Nitrat ist aufgehoben; die Repression durch Sauerstoff bleibt unbeeinflusst.
- Durch Zugabe von Formiat kann auch die aerobe Repression überwunden werden.

Das Fehlen des internen Induktors Formiat könnte der Grund für die verbliebene Repression durch Sauerstoff in diesen Mutanten sein. Ein intaktes FNR-Protein ist auch für die aerobe Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase in den redoxinsensitiven Mutanten notwendig. Daraus können mehrere Schlüsse gezogen werden:

- Das FNR-Protein ist nicht nur unter Anaerobiose, sondern generell für die Transkription anaerob exprimierter Gene erforderlich.
- Das FNR-Protein wird auch unter aeroben Bedingungen synthetisiert.

Die Mutationen erwiesen sich als cis-dominant, was auf eine Veränderung der Bindestelle für ein eventuelles Regulatorprotein in der Promotor-Operator-Region hinweist. Die Frage, ob dem FNR-Protein diese Rolle zukommt, läßt sich durch die bis jetzt durchgeführten Versuche nicht beantworten.

#### 4. Charakterisierung der fdhH::lac Fusion

Durch physiologische und enzymatische Analyse wurde gezeigt, daß im Stamm M9s (fdhH::lac Fusion) unter anaeroben Bedingungen der Elektronentransport zu Nitrat völlig intakt ist, während der Transport zur Hydrogenase nicht mehr stattfindet. Franz Zinoni konnte die Fusion bei Minute 94 auf dem E. coli Chromosom kartieren, somit in einem Bereich, in dem bis jetzt noch keine FDH<sub>H</sub> Gene lokalisiert wurden.

Eine genaue genetische und biochemische Charakterisierung der FDH<sub>H</sub> steht jedoch noch aus, was wohl in der extremen Labilität des Enzyms gegenüber Sauerstoff begründet liegt.

Aufgrund von Markierungsversuchen mit <sup>75</sup>Se-Selenit konnte nachgewiesen werden, daß der Mu-Page in das Selenopeptid der FDH<sub>H</sub> inseriert hatte. Durch die Insertion kommt es zu einem vorzeitigen Transkriptionsstop und damit zur Synthese eines um 20 Kd kürzeren Peptids. Ein Einbau von Selen ist jedoch auch noch in dieses Rumpfpeptid möglich und damit nicht abhängig von der Synthese eines intakten Polypeptids. Die Synthese des verkürzten Polypeptids zeigt das gleiche regulatorische Verhalten wie die der unter fdh-Kontrolle stehenden  $\beta$ -Galaktosidase. Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß die Synthese beider Polypeptide gekoppelt abläuft, und das Auftreten des 60 Kd Peptids wirklich ursächlich mit der Insertion des Mu-Phagen zusammenhängt.

Die Behandlung der Selenopeptide von Wildtyp und Fusionsmutante mit Cyanbromid führte zum Auftreten gleicher Spaltprodukte. Cyanbromid reagiert mit dem Schwefel des Methionin und führt, über ein Lacton als Zwischenstufe, zum Kettenabbruch.

Eine schwache Reaktion findet auch mit Cystein statt.

Die Selenopeptide mit der ursprünglichen Länge waren auf dem Autoradiogramm noch als schwache Banden zu erkennen, was auf eine unvollständige Umsetzung mit Cyanbromid hinweist. Es ist deshalb nicht möglich, die Anzahl der eingebauten Selenmole-

küle anzugeben. Festzuhalten ist, daß durch das Auftreten identischer Spaltprodukte die genetische Identität beider Peptide wahrscheinlich gemacht wird.

Eine Zuordnung des Selenopeptids der  $FDH_H$  zu einem unter Anaerobiose dereprimierten Protein war nicht möglich, da die  $FDH_H$  erst in der späten stationären Wachstumsphase synthetisiert wird, nach ausreichender Ansäuerung des Mediums.

Auf coomassiegefärbten Gelen von stationären Kulturen konnte sowohl das Selenopeptid der  $FDH_H$  als auch das der  $FDH_N$  lokalisiert werden.

---

## E. ZUSAMMENFASSUNG

---

Die Regulation der Synthese von Proteinen, die an der Umstellung des Stoffwechsels von Aerobiose und Anaerobiose beteiligt sind, wurde am Beispiel der Pyruvat-Formiat-Lyase und Formiat-Hydrogen-Lyase von *E. coli* untersucht.

Dabei wurden folgende Resultate erhalten:

1. Pyruvat-Formiat-Lyase besitzt, entgegen früheren Vorstellungen, eine  $\alpha_2$ -Untereinheitenstruktur. Sauerstoffentzug führt gleichzeitig zu einer Aktivierung des aeroben Grundspiegels und zur Derepression der Enzymsynthese. Unter Anaerobiose ist die Enzymmenge um etwa das Vier- bis Fünffache erhöht.

Über verschiedene Methoden wurde eindeutig gezeigt, daß das Strukturgen der PFL auf p29 kloniert wurde. Die Erhöhung der Gendosis führt zu einer zirka zehnfachen Überproduktion des Enzyms, was zur Folge hat, daß unter anaeroben Bedingungen 30 % des Gesamtzellproteins von der PFL gestellt werden.

2. Die Regulation des Formiat-Hydrogenlyase-Komplexes auf der Ebene der Transkription konnte über lac-Fusionen, die in den entsprechenden Genen über verschiedene physiologische Tests lokalisiert wurden, studiert werden. Die in der Literatur beschriebenen und von uns erarbeiteten Regulationsphänomene sollen im folgenden Arbeitsmodell zusammengefaßt werden (Abb. 17).

siehe Abbildung 17 →

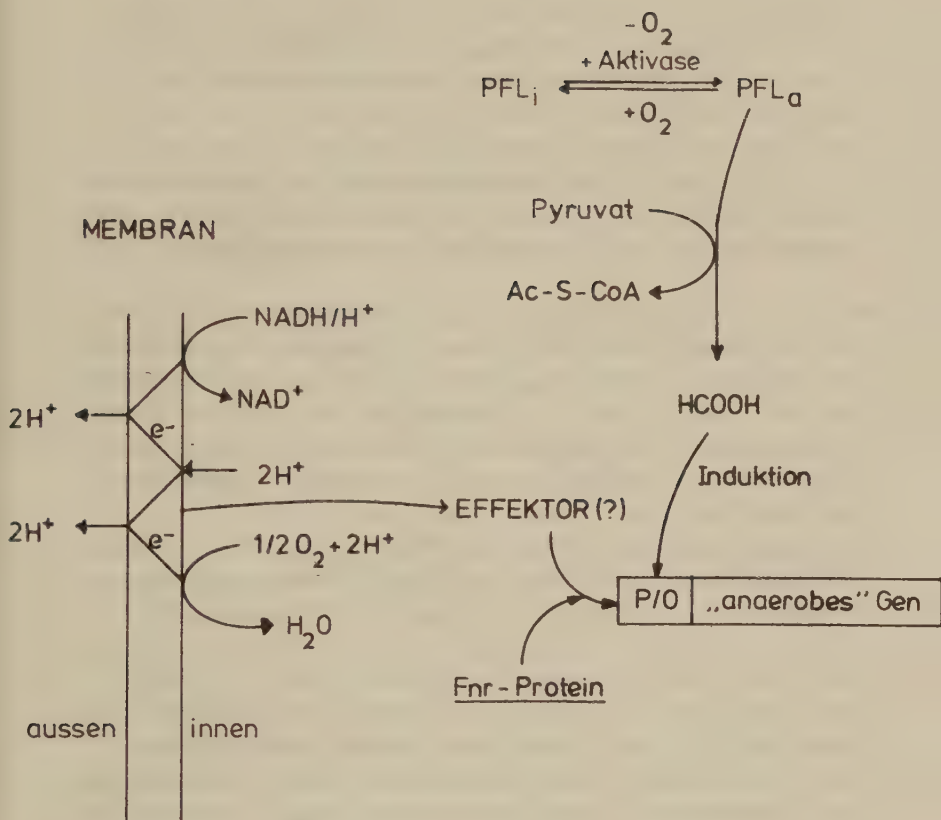


Abbildung 17:

*Modell zur Regulation der Transkription anaerob exprimierter Gene (Zinoni, 1983).*

- Nach unseren Ergebnissen scheint die Höhe des Redoxpotentials, die mit dem Ablauf eines Elektronentransports in einer Atmungskette in Zusammenhang steht, der übergeordnete Regulationsparameter zu sein. Wie diese Redoxkontrolle

ausgeübt wird und von welchem Molekül schließlich der Redoxzustand der Zelle sensiert wird, läßt sich bis jetzt noch nicht schlüssig beantworten. Möglicherweise übernimmt eine Komponente der Elektronentransportkette zu Sauerstoff oder Nitrat diese Rolle (Effektor ? auf Abb. 17). Eine Modellvorstellung wäre, daß abhängig vom Redoxpotential in der Zelle dieses Molekül in der oxidierten beziehungsweise reduzierten Form vorliegt und dadurch eine Signalwirkung auf die Transkription anaerober Gene ausübt.

- Die aktivierende Wirkung des FNR-Proteins auf die Transkription anaerober Enzymsysteme konnte durch die hier durchgeführten Regulationsuntersuchungen in den lac-Fusionsstämmen bestätigt werden. Nicht auszuschließen ist, daß das FNR-Protein selbst den Redoxzustand sensieren kann und über eine Konformationsänderung seine Eigenschaft als Aktivator verliert. Daten dazu liegen jedoch noch nicht vor. Eine Steuerung seiner Aktivität durch cyclo-AMP, ähnlich dem CAP-Protein, wie Guest und Mitarbeiter (Unden und Guest, 1984) vermuten, widerspricht dieser Vorstellung jedoch.
  - Eine stimulierende Wirkung von Formiat, erzeugt durch die PFL katalysierte Spaltung von Pyruvat unter anaeroben Bedingungen, auf die Transkription anaerob dereprimierter Gene, konnte durch die Untersuchungen an den isolierten lac-Fusionsstämmen im Formiat-Hydrogenase-Komplex nachgewiesen werden. Ob dieser Effekt generell auf alle "anaeroben" Gene ausgeübt wird, bleibt zu überprüfen.
-

## F. LITERATURVERZEICHNIS

---

- Adams MWW, Hall DO (1979) Biochem J. 183: 11-22
- Amarasingham CR, Davis BD (1965) J. Biol. Chem. 240: 3664-3668
- Bachmann BJ, Low KB, Taylor AL (1976) Bact. Reviews 40: 116-167
- Bloch PL, Phillips TA, Neidhardt FC (1980) J. Bacteriol. 141: 1409-1420
- Casadaban MJ, Cohen SN (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4530-4533
- Chang ACY, Cohen SN (1978) J. Bacteriol. 134: 1141-1156
- Chen C, Stadtman TC (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1403-1407
- Ching W-M, Stadtman TC (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 374-377
- Chippaux M, Giudici D, Abou-Jaoudé A, Casse F, Pascal MC (1978) Mol. Gen. Genet. 160: 225-229
- Christiansen L, Pedersen S (1981) Mol. Gen. Genet. 181: 548-551
- Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli VK (1977) J. Biol. Chem. 252: 1102-1106

- Clewell DB, Helinski DR (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
62: 1159-1166
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
69: 2110-2114
- Cole JA, Wimpenny JWT (1966) Biochim. Biophys. Acta 128: 419-425
- Cole JA, Wimpenny JWT (1968) Biochim. Biophys. Acta 162: 39-48
- Cole ST, Guest JR (1978) Soc. Gen. Microbiol. Quart. 6: 42-43
- Cole ST, Guest JR (1980) Mol. Gen. Genet. 179: 377-385
- Cox JC, Edwards ES, DeMoss JA (1981) J. Bacteriol. 145: 1317-1324
- Cox JC, Knight R (1981) FEMS Microbiol. Lett. 12: 249-252
- Enoch HG, Lester RL (1975) J. Biol. Chem. 250: 6693-6705
- Fröhler J, Rechenmacher A, Thomale J, Nass G, Böck A (1980) J. Bacteriol. 143: 1135-1141
- Geyl D, Böck A (1977) Mol. Gen. Genet. 154: 327-334
- Glaser JH, DeMoss JA (1972) Mol. Gen. Genet. 116: 1-10
- Graham A, Jenkins H, Smith N, Mandrand-Berthelot M-A, Haddock BA, Boxer DH (1980a) FEMS Microbiol. Lett. 7: 145-151
- Graham A, Boxer DH, Haddock BA, Mandrand-Berthelot M-A, Jones RW (1980b) FEBS Lett. 113: 167-172
- Gray CT, Wimpenny JWT, Hughes DE, Mossman MR (1966a) Biochim. Biophys. Acta 117: 22-32

- Gray CT, Wimpenny JWT, Mossman WR (1966b) *Biochim. Biophys. Acta* 117: 33-41
- Gross E, Witkop B (1962) *J. Biol. Chem.* 237: 1856-1860
- Haddock BA, Jones CW (1977) *Bacteriol. Rev.* 41: 47-99
- Hansen RG, Henning V (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 122: 355-358
- Henning V (1963) *Biochem. Z.* 337: 490-504
- Hespell RB (1976) *J. Bacteriol.* 128: 677-680
- Hirsch CA, Rasminsky M, Davis BD, Lin ECC (1963) *J. Biol. Chem.* 238: 3770
- Kalnitsky G, Werkam CH (1943) *Arch. Biochem.* 2: 113-124
- Knappe J, Schacht J, Möckel W, Höpner T, Vetter H jr, Edenharder R (1969) *Eur. J. Biochem.* 11: 316-327
- Knappe J, Blaschkowski HP, Edenharder R (1972) in: *Metabolic Interconversion of Enzymes* (Wieland O, Helmreich E, Holzer H, eds.), 319-329. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- Knappe J, Blaschkowski HP, Grobner P, Schmitt T (1974) *Eur. J. Biochem.* 50: 253-263
- Knappe J, Blaschkowski HP (1975) *Methods in Enzymology* 41: 508-518
- Knappe J, Schmitt T (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 1110-1117

- Knappe J, Neugebauer FA, Blaschkowski HP, Gänzler M (1984)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1332-1335
- Kotlarz DH, Garreau H, Buc H (1975) Biochim. Biophys. Acta  
381: 257-268
- Krebs HA (1972) in: Essays in biochemistry (Campbell PN and  
Dickens F, eds.), Vol. 8: 1-34. Academic Press, Inc.,  
New York
- Laemmli VK (1970) Nature 227: 680-685
- Lambden RP, Guest JR (1976) J. Gen. Microbiol. 97: 145-160
- Lennox ES (1955) Virology 1: 190
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) J. Biol.  
Chem. 193: 265-275
- Lester RL, DeMoss JA (1971) J. Bacteriol. 105: 1006-1014
- Mandrand-Berthelot MA, Wu MYK, Haddock BA (1978) FEMS Micro-  
biol. Lett. 4: 37-40
- McKay DB, Weber IT, Steitz TA (1982) J. Biol. Chem. 257:  
9518-9524
- Miller JH (1972) in: Experiments in Molecular Genetics. Cold  
Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Newman BM, Cole JA (1978) Gen. Microbiol. 106: 1-12
- Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF (1974) J. Bacteriol. 119:  
736-747
- Novelli GD, Gest H, Krampitz LO (1954) Federation Proc. 13: 270

- O'Farrell PH (1975) J. Biol. Chem. 250: 4007-4027
- O'Farrell PH, Goodman HM, O'Farrell PHO (1977) Cell 12: 1133-1142
- Oster MO, Wood NP (1964) J. Bacteriol. 87: 104
- Pascal MC, Chippaux M, Abou-Jaoudé A, Blaschkowski HP, Knappe J (1981) J. Gen. Microbiol. 124: 35-42
- Pecher A, Blaschkowski HP, Knappe J, Böck A (1982) Arch. Microbiol. 132: 365-371
- Pecher A, Zinoni F, Jatisatienr C, Wirth R, Hennecke H, Böck A (1983) Arch. Microbiol. 136: 131-136
- Peck HD jr, Gest H (1957) J. Bacteriol. 73: 706-721
- Pedersen S, Bloch PL, Reeh S, Neidhardt FD (1978) Cell 14: 179-190
- Phillips TA, Bloch PL, Neidhardt FC (1980) J. Bacteriol. 144: 1024-1033
- Pichinoty F (1962) Biochim. Biophys. Acta 64: 111
- Pichinoty F (1969) Ann. Inst. Pasteur 117: 3-15
- Pinsent J (1954) Biochem. J. 57: 10-16
- Ruiz-Herrera J, DeMoss JA (1969) J. Bacteriol. 99: 720-729
- Ruiz-Herrera J, Alvarez A, Figueroa I (1972) Biochim. Biophys. Acta 289: 254-261
- Sancar A, Hack AM, Rupp WD (1979) J. Bacteriol. 137: 692-693

- Sanwal BD (1970) Bacteriol. Rev. 34: 20-39
- Schreyer R, Böck A (1980) Arch. Microbiol. 127: 289-298
- Shaw DJ, Guest JR (1981) Mol. Gen. Genet. 181: 95-100
- Shaw DJ, Guest JR (1982a) J. Gen. Microbiol. 128: 2221-2228
- Shaw DJ, Guest JR (1982b) Nucl. Acids Res. 10: 6119-6129
- Shaw DJ, Rice DW, Guest JR (1983) J. Mol. Biol. 166: 241-247
- Shaw MK, DeMoss JA (1968) J. Bacteriol. 95: 1305-1313
- Shine J, Dalgarno L (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1342-1346
- Smith MW, Neidhardt FC (1983a) J. Bacteriol. 154: 344-350
- Smith MW, Neidhardt FD (1983b) J. Bacteriol. 154: 336-343
- Spencer ME, Guest JR (1973) J. Bacteriol. 114: 563-570
- Stouthamer AH (1969) Ant. van Lee. Serol. 35: 505-521
- Takagi M, Ishimoto M (1983) FEMS Microbiol. Lett. 17: 247-250
- Terrière C, Giordano G, Medani CL, Boxer DH, Haddock BA, Azoulay E (1981) FEMS Microbiol. Lett. 11: 287-293
- Thomas AD, Doelle HW, Westwood AW, Gordon GL (1972) J. Bacteriol. 112: 1099-1105
- Uden G, Guest JR (1984) FEBS Letters 170, 321-325
- Utter MF, Werkman CH (1944) Arch. Biochem. 5: 413-422

Varenne S, Casse F, Chippaux M, Pascal MC (1975) Mol. Gen. Genet. 141: 181-184

Wimpenny JWT, Cole JA (1967) Biochim. Biophys. Acta 148: 233-242

Wittmann HG (1983) Ann. Rev. Biochem. 52: 35-65

Zinoni F (1983) Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Zinoni F, Beier A, Pecher A, Wirth R, Böck A (1984) Arch. Microbiol., im Druck



Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. A. Böck für die intensive wissenschaftliche Förderung, die er mir zuteil werden ließ.

Durch große Diskussionsbereitschaft und wertvolle Ratschläge unterstützte er mich stets bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. J. Knappe für die Bereitstellung des gereinigten Enzyms Pyruvat-Formiat-Lyase.

Franz Zinoni danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und Margit Geier für die sorgfältige Reinschrift dieser Arbeit.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

- 23.10.1954: Geboren in Großarmschlag, Kreis Freyung/Grafenau, als erstes von zwei Kindern der Eheleute Josef und Agathe Lentner
- 26.10.1979: Heirat mit Thomas Pecher; verwitwet seit Dezember 1980

### Schulbesuch und Studium:

- 1961 - 1965: Besuch der Volksschule in Langdorf
- 1965 - 1974: Besuch des Naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Zwiesel - Abitur
- WS 1974 - SS 1976: Studium an der Pädagogischen Hochschule in Regensburg
- WS 1976 - WS 1980: Studium der Biologie an der Universität Regensburg
- 13.10.1980: Abschluß des Studiums mit dem Diplom (Diplomarbeit angefertigt am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg)
- ab November 1980 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Böck









